

METABOLISMUS VON CHLORPROMAZIN DURCH INTESTINUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Roswitha Knoll
aus Berlin

Berlin 1978

METABOLISMUS VON CHLORPROMAZIN DURCH
INTESTINUM

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Roswitha Knoll
aus Berlin

Berlin 1978

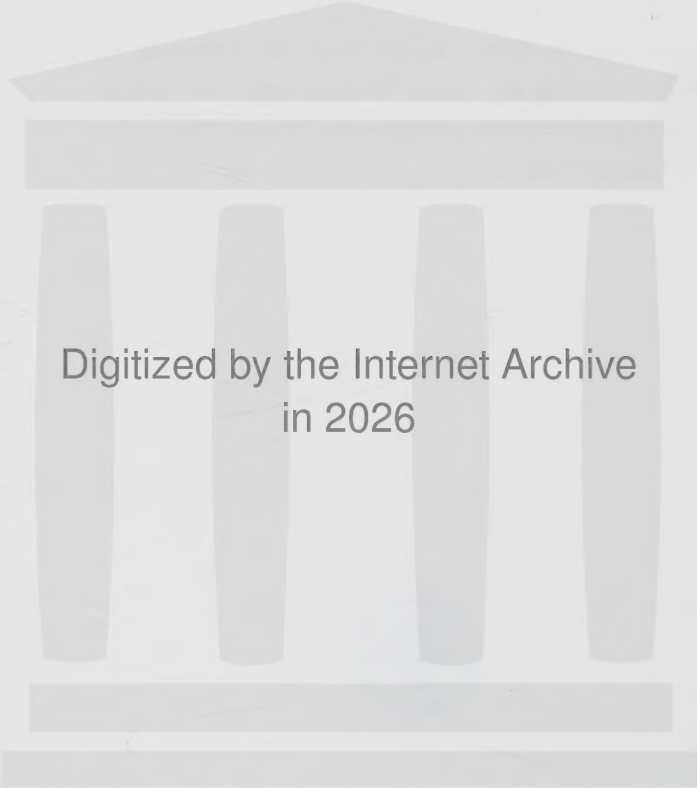
1. Referent: Professor Dr. Helmut Coper

2. Referent: Professor Dr. Karl-Heinz Frömming

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 10. 1978



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von
Herrn Professor Dr. med. Helmut Coper im Institut
für Neuropsychopharmakologie der Freien Universität
Berlin angefertigt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Methodik</u>	6
I Tiermaterial	6
II Versuchssubstanzen	6
III Geräte	8
IV Identitäts- und Reinheitsprüfung der Vergleichssubstanzen	9
V Gewinnung der Mikrosomenfraktion	10
VI Proteinbestimmung	12
VII Cytochrom - P ₄₅₀ - Bestimmung	13
VIII Vorversuche	13
IX Chlorpromazinabbau in vitro	16
X Kontrollwerte	20
XI Qualitative Analyse	20
XII Quantitative Analyse	21
XIII Bestimmung der Wiederfindungsraten	21
XIV Bestimmung der kinetischen Konstanten	22
<u>Ergebnisse</u>	26
I Vorversuche	26
II Identitäts- und Reinheitsprüfung der Vergleichssubstanzen	26

	Seite
III Zählausbeute	30
IV Wiederfindungsrate	32
V Vergleich der Methoden zur Radioaktivitätsmessung	32
VI Cytochrom - P ₄₅₀ - Bestimmung	32
VII Haltbarkeit der Mikrosomen	43
VIII Sulfoxidation und Demethylierung von Chlorpromazin und Perazin	45
IX Reaktionshemmung	62
X Bestimmung der Michaelis-Konstanten	62
XI Zeitabhängigkeit	72
XII Selbstinduktion	72
<u>Diskussion</u>	79
<u>Zusammenfassung</u>	101
<u>Literaturverzeichnis</u>	103

Einleitung

Phenothiazin wurde gegen Ende des letzten Jahrhunderts synthetisiert, aber erst 1934 als Anthelmintikum und Insektizid verwendet. Etwa 5 Jahre später entdeckte man die Antihistamin-Wirkung des substituierten Phenothiazins, Promethazin und dessen sedativen Effekt. 1952 beobachteten DELAY und DENIKER, daß Chlorpromazin eine auffallende Besserung psychotischer Erkrankungen bewirkt. Seitdem gilt die Substanz als Prototyp der Neuroleptika.

Im Tierexperiment haben die Phenothiazin-Neuroleptika ein breites Wirkungsspektrum. Sie setzen die Spontanaktivität herab. Mit steigender Dosis wird der allgemein dämpfende Effekt stärker, ohne daß eine Narkose auftritt. Bei niedriger Umgebungstemperatur kommt es zu einer Hypothermie. Auch andere vegetative Regulationssysteme werden beeinflusst.

Viele Neuroleptika weisen einen starken antiemetischen und Antihistamineffekt auf. Schließlich haben sie einen eindrucksvollen Zähmungseffekt bei aggressiven Rhesusaffen und beeinflussen konditioniertes Verhalten.

Chlorpromazin besitzt alle diese Eigenschaften, vorwiegend aber sympatholytische, sedative, antiemetische und parasympatholytische Wirkungen.

Beim Menschen greifen neuroleptisch wirkende Phenothiazine in das vegetative und extrapyramidale System ein. Im autonomen Nervensystem wirken sie vorwiegend sympatholytisch.

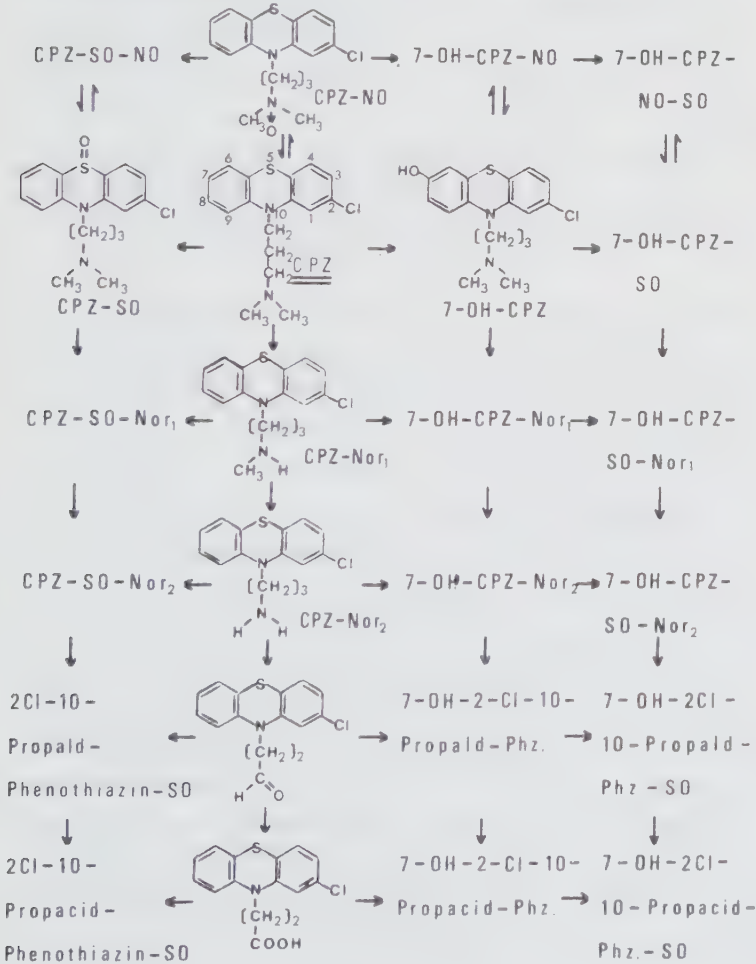
Bei Verwendung von Chlorpromazin bei psychotischen Patienten kommt es in der ersten Phase der Behandlung zur Sedierung und psychomotorischer Dämpfung, in der zweiten Phase zu anhaltender Antriebsminderung. In der dritten Phase distanziert sich der Patient von psychotischen Erlebnissen. Bei zunehmender Krankheitseinsicht beginnt der emotionale Ausgleich.

Bei länger anhaltender Behandlung können parkinsonartige Symptome auftreten.

Der Wirkungsmechanismus der Neuroleptika ist noch nicht eindeutig geklärt. Psychische Störungen werden mit einer Änderung im Stoffwechsel der aromatischen Monoamine Noradrenalin, Dopamin und Serotonin in Verbindung gebracht. Neuroleptika bewirken entweder eine Änderung der Speicherkapazität spezifischer Granula, in denen die Monoamine enthalten sind, oder sie führen zu einer Abdichtung der Membran der Speicherorganellen, bzw. zu einer verminderten Empfindlichkeit der Rezeptoren. In verschiedenen Teilen des Gehirns, vornehmlich im nucleus caudatus und nucleus accumbens, ist eine Adenylcyclase gefunden worden, die als "Dopamin-Rezeptor" angesehen wird. Die Stimulierung dieses Enzyms durch Dopamin wird durch neuroleptisch wirkende Phenothiazine schon in Konzentrationen von 10^{-7} - 10^{-8} mol/l verhindert (COPER, 1977).

Chlorpromazin wird nach peroraler und parenteraler Gabe gut resorbiert und rasch in allen Körpergeweben verteilt. 168 mögliche Metaboliten des Pharmakons wurden postuliert und viele davon aus menschlichem Urin isoliert. Die Haupt-

abbauwege sind Demethylierung, Oxidation am Schwefel- und am Stickstoffatom, Hydroxylierung (nur beim nicht sulfoxierten Molekül) und Glucuronidierung (GILMAN / COCCIA und WESTERFELD, 1967).



Bei Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (SAKALIS et al., 1972; RIVERA-CALIMLIM et al., 1973; 1975) über den Metabolismus des Chlorpromazins in vivo zeigte sich, daß Patienten, die auf Chlorpromazinbehandlung gut ansprachen, im allgemeinen höhere Plasmakonzentrationen an unverändertem Chlorpromazin oder aktiven Metaboliten, wie z.B. 7-Hydroxy-Chlorpromazin, aufwiesen (LAL und SOURKES, 1971; POSNER et al., 1962; MANIAN et al., 1971; CLARK und KAUL, 1975). Allerdings ergab die Urinanalyse von therapieresistenten und nicht resistenten Patienten keinen Unterschied in der Metabolismusrate (SVED, PERALES und PALAIC, 1971).

1973 fanden SAKALIS et al. im Plasma von Schizophrenen, deren Symptomatik auf Chlorpromazin nicht ansprach, hohe Konzentrationen an Chlorpromazinsulfoxid, einem der biologisch inaktiven Hauptmetaboliten (DAVIDSON et al., 1957; SALZMAN und BRODIE, 1956). ADAMSON et al. (1973) erzielten bei sogenannten "non-responders" nach parenteraler Injektion bessere Ergebnisse als nach peroraler Gabe. Andere Untersuchungen (CURRY et al., 1970; CURRY et al., 1971; LEWIS et al., 1971; CURRY, 1971) bestätigten diesen Befund und wiesen darauf hin, daß die niedrigere Chlorpromazinplasmakonzentration nach oraler Anwendung nicht durch schlechte Resorption oder besonders gute Stoffwechselleistung der Leber bedingt sein muß, sondern die Substanz schon im Darm während der Absorption abgebaut werden kann. Genauere Untersuchungen über die Inaktivierung von Chlorpromazin im Darm sind jedoch nur vereinzelt unternommen worden (MINDER et al., 1971; CURRY et al., 1971).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgender Frage:

Unter welchen Bedingungen wird Chlorpromazin zum Sulfoxid und anderen Metaboliten in der Darmmukosa enzymatisch verstoffwechselt?

Methodik

I Tiermaterial

Ratten: weiblich; Typ: Wistar; Gewicht: 160 - 200 g;

Lieferant: Tierzuchtfarm Hagemann, Hannover.

Meerschweinchen: weiblich; Typ: Kopenhagen; Gewicht:

350 - 450 g; Lieferant: Bundesgesundheitsamt Berlin.

Tierfutter: Standard-Diät Altromin R10, bzw. Kaninchen-Alleinfutter Typ Z und Leitungswasser ad libitum.

II Versuchssubstanzen

Chlorpromazin-HCl von Bayer AG, Leverkusen.

Chlorpromazinsulfoxid (CPZ-SO),

Monodesmethylchlorpromazin (CPZ-Nor₁),

Monodesmethylchlorpromazinsulfoxid (CPZ-SO-Nor₁),

7-Hydroxy-Chlorpromazin (7-OH-CPZ),

Didesmethylchlorpromazinsulfoxid (CPZ-SO-Nor₂),

Chlorpromazinsulfon (CPZ-SO₂),

Chlorpromazinstickoxid (CPZ-NO),

sulfoxidiertes Chlorpromazinstickoxid (CPZ-SO-NO)

von Rhône-Poulenc, Paris.

(³⁵S)-CPZ, β -Strahler, spezifische Aktivität: 7,4 mCi/mMol,

HWZ: 87,2 Tage; Lieferant: Amersham Buchler.

Perazin und (³⁵S)-Perazin, Lieferant: Institut für Biochemie

der Freien Universität Berlin. (Die markierte Substanz stand nur begrenzt und mit relativ geringer spezifischer Aktivität zur Verfügung. Es wurden daher nur einige orientierende Versuche mit Perazin durchgeführt.)

Fließmittel

- | | |
|---|----------------------|
| A) Aceton / Methanol / Triäthanolamin | (100 / 30 / 1) |
| B) Aceton / Methanol / Ammoniak (25 %ig) | (100 / 40 / 1) |
| C) Methanol / Aceton / Wasser | (100 / 100 / 2) |
| D) Isopropanol / Chloroform / Wasser /
Ammoniak (25 %ig) | (128 / 64/8,8/7,2) |
| E) Essigsäureisopropylester / Isopropanol /
Eisessig / Wasser / Methanol | (58/19/14/9/10) |
| F) Äthanol / Essigsäure / Wasser | (50 / 20 / 10) |

Sprühmittel

- A) Cer(IV)-sulfat-Phosphorsäure:
 1g Cer(IV)-sulfat + 99g 85 %ige Phosphorsäure (DAB 7)
- B) 50 ml 18N Schwefelsäure, 150 ml Äthanol und 0,5g Eisen-(III)-Chlorid
- C) Schwefelsäure / Äthanol / Wasser (2 / 2 / 1)
- D) 5 %ige Eisen(III)-Chloridlösung in Wasser

Puffer

- A) Tris-HCl-Puffer, pH: 7,5

B) Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, Zusammensetzung:

- | | |
|--|-----------|
| a) 0,90 % NaCl | (0,154 M) |
| b) 1,15 % KCl | (0,154 M) |
| c) 1,22 % CaCl_2 | (0,110 M) |
| d) 2,11 % KH_2PO_4 | (0,154 M) |
| e) 3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | (0,154 M) |
| f) 1,30 % NaHCO_3 | (0,154 M) |

100 Teile Lösung a

4 Teile Lösung b

3 Teile Lösung c

1 Teil Lösung d

1 Teil Lösung e

21 Teile Lösung f

+ 0,01 mg/ml EDTA

Szintillationslösung

6 g Butyl-PBD/1 Toluol

(Butyl-PBD = 2(4'- α -Butylphenyl)-5-(4'-biphenyl)-1,3,4-Oxadiazolin)

III Geräte

Potter-Elvehjem Homogenisator, Jahnke und Kunkel KG,

Typ RM 22;

Ultrazentrifuge: Spinco 50;

Ultrazentrifuge: MSE High Speed 18;

Schüttelwasserbad, Köttermann;

Rotavapor, Büchi;

UV-Lampe (254 nm und 366 nm);

Photometer, Carl Zeiss;

UV-Spektrophotometer, Unicam Philipps;

Dünnschichtscanner, II LB 2723 Bertholt (er dient zur quantitativen Auswertung radioaktiv markierter Dünnschichtchromatogramme direkt von der Platte mit Hilfe einer von Methanogas durchströmten Zählkammer);

Flüssigkeitsszintillationszähler, Tricarb Modell 3380 Packard, (in ihm wird die aus dem Kernzerfall entstandene Energie durch das Lösungsmittel in Lichtquanten umgewandelt und deren Intensität gemessen, seine Zählausbeute ist ca. 30-fach höher als die des Dünnschichtscanners);

Dünnschichtplatten: Precoated silica gel plates, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm, mit Fluoreszenzindikator bei 254 nm, Merck AG Darmstadt.

IV Identitäts- und Reinheitsprüfung der Vergleichssubstanzen

CPZ·HCl, CPZ-SO, CPZ-Nor₁, CPZ-SO-Nor₁, CPZ-SO-Nor₂, CPZ-SO₂, CPZ-NO, CPZ-SO-NO und 7-OH-CPZ wurden dünn-schichtchromatographisch auf Identität und Reinheit geprüft.

Die RF-Werte wurden mit den Angaben von TURANO und TURNER (1973) verglichen. Als Fließmittel dienen:

Aceton / Methanol / Triäthanolamin (100 / 30 / 1) und

Aceton / Methanol / Ammoniak (25%ig) (100 / 40 / 1).

Außerdem wurden von Chlorpromazin und Chlorpromazinsulf-oxid UV-Spektren geschrieben. Die Ergebnisse wurden mit den Angaben von De LEENHEER (1973) verglichen.

Bestimmung der Zählausbeute des radioaktiv markierten Chlorpromazins

Die gelieferte Substanz war ^{35}S -markiert mit einer spezifischen Aktivität von 7,4 mCi/mMol. HWZ: 87,2 Tage.

Die Zählausbeute wurde 4mal 8 Tage nach ihrer Synthese im Flüssigkeitsscintillator bestimmt. Dazu wurden je $1,4 \times 10^{-4}$ mg (^{35}S)-CPZ in 1,5 ml eines Chloroform-Methanol-(2+1, V/V)-Gemisches gelöst, mit 15 ml Scintillator geschüttelt und nach Abkühlen auf 4°C gemessen.

V Gewinnung der Mikrosomenfraktion

1) durch Differentialzentrifugation (FOUTS und BRODIE, 1957)

a) aus Ratten- und Meerschweinchenleber:

Die Tiere wurden dekapitiert, deren Leber entnommen, gewogen, zerkleinert und in der vierfachen Menge Pufferlösung (Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, $\text{pH} \sim 7$) homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 10 000 g. dessen Überstand erneut bei 105 000 g 60 min zentrifugiert. Der Rückstand enthält die Mikrosomen, die in wenig Puffer suspendiert, kurz homogenisiert, in mehrere Portionen zu je 0,6 ml geteilt und bei -25°C eingefroren wurden. Die Herstellung erfolgte bei $+4^{\circ}\text{C}$.

b) Mikrosomengewinnung aus Darmgewebe:

Die Tiere wurden dekapitiert, der Dünndarm entnommen und in kalte, isotonische KCl-Lösung (1,15 %) gelegt. Menschliche Dünndarmteile waren Operationsmaterial. Sie wurden sofort nach der Entnahme durch Prof. HÄRING (Universitätsklinikum

Steglitz) bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufgearbeitet. Alle Präparationen wurden mit 1,15 %iger KCl-Lösung gespült, in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer gegeben und der Länge nach aufgeschnitten. Mit dünnen Glasplättchen wurde die Mukosa abgeschabt, gewogen und in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (1+4) homogenisiert. Der weitere Arbeitsgang entsprach der Herstellung von Leber-mikrosomen.

2) durch Ca-Aggregation (KAMATH et al., 1971; KAMATH und RUBIN, 1972; KUPFER und LEVIN, 1972; SCHENKMANN und CINTI, 1972)

Leber- bzw. Darmmukosa wurde mit einer isotonen Saccharose-Lösung (pH 7,5) zu einen 20-25 %igen Homogenat verarbeitet. Die Lösung bestand aus:

0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5),

0,005 M MgCl_2 ,

0,025 M KCl und

0,008 M CaCl_2 in

0,154 M Saccharose.

Das Homogenat wurde bei 10 000 g 15 min zentrifugiert und der Überstand in die fünffache Menge

0,0125 M Saccharose,

0,008 M CaCl_2 und

0,005 M MgCl_2 gegeben.

Die gesamte Lösung wurde mehrmals gerührt und nach einigen Minuten bei 1 500 g 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dispergiert, noch zweimal bei 1 500 g 10 min in 0,0125 molarer Saccharoselösung zentrifugiert und anschließend in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, der zusätzlich noch 0,005 M MgCl_2 und 0,025 M KCl enthielt, homogenisiert.

Die Suspension wurde entweder bei -25°C eingefroren oder sofort weiterverwendet.

Die nach 1) a und b bzw. 2) gewonnenen Mikrosomensuspensionen aus Darm und Leber dienten dann als Enzymquelle für die Untersuchungen zur Metabolisierung von Chlorpromazin.

VI Proteinbestimmung der Mikrosomenfraktionen (LOWRY et al., 1951)

Reagenzien:

A) 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

B) 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und 2 % Na- oder K-Tartrat

(Vor Gebrauch werden beide Lösungen 1 : 1 gemischt.)

C) Folin-Reagenz + Wasser (1 / 1)

D) Eichlösung: 10 mg Serumalbumin auf 100 ml Wasser.

Die zu bestimmenden Mikrosomensuspensionen wurden 1 : 100 mit Wasser verdünnt. Zu 0,1 bis 0,3 ml der Verdünnung wurde 1 ml Reagenz A+B (50 + 1) gegeben und die Probe mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Danach wurde 0,1 ml Reagenz C hinzugefügt, geschüttelt und nach 45 min die Extinktion bei 750 nm gemessen. Anhand einer Eichreihe mit Serumalbumin kann aus Proben mit verschiedener Mikrosomen- bzw. Eiweißmenge die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Farbreaktion entsteht bei der Reduktion des Folinreagenzes durch das mit Kupfer vorbehandelte Protein. Mit dieser Methode lassen sich noch Proteinmengen bis zu 0,2 γ nachweisen.

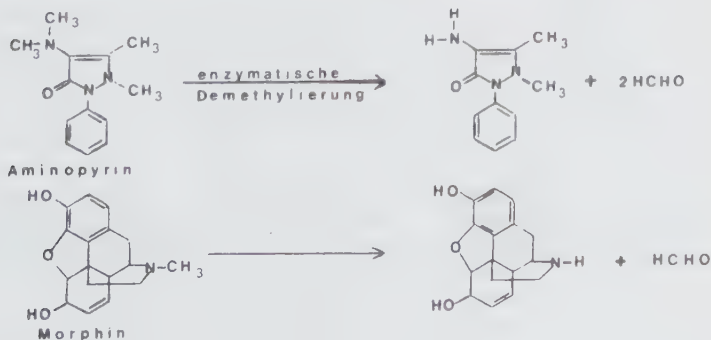
VII Cytochrom-P₄₅₀-Bestimmung (OMURA und SATO, 1964, I u. II)

Die Bestimmung des Cytochrom-P₄₅₀-Gehalts der Mikrosomen erfolgte im UV-Spektrophotometer. Die Mikrosomensuspension wurde mit Puffer (pH 7,5) auf 1 - 4 mg Protein/ml verdünnt und in beide Küvetten gefüllt. Nach Festlegung der Grundlinie wurden der Meßküvette 5 µl einer NADH-Lösung (20 mg/ml) zugesetzt. Dabei entsteht ein Differenzspektrum, aus dem bei $\lambda = 409 - 424 \text{ nm}$ ($\epsilon = 170 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) der Gehalt an Cytochrom b₅ berechnet werden kann. Danach wurde die Meßküvette 40 Sekunden lang mit Kohlenmonoxid begast und in beide Küvetten wenige mg Na-Dithionit gegeben. Das sich nun entwickelnde Differenzspektrum wurde zwischen 350 und 500 nm aufgezeichnet. Aus der Extinktion bei $\sim 450 \text{ nm}$ kann der Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt pro mg Protein mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \epsilon \times c \times d$) berechnet werden ($\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

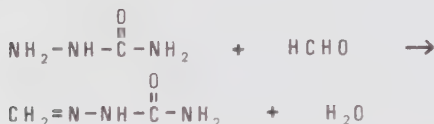
VIII Vorversuche

Demethylierung von Aminopyrin und Morphin mit Mikrosomen von Rattenleber und -darm.

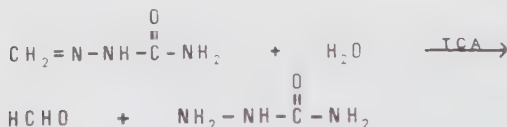
Es entstehen folgende Produkte:



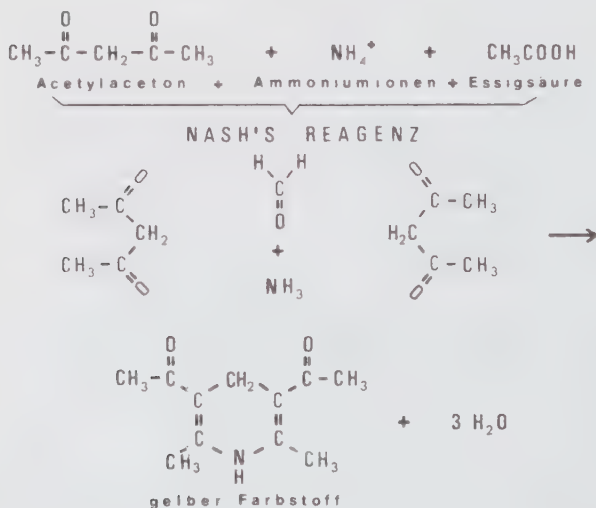
Bei dieser Reaktion dienen Mg^{2+} -Ionen als Katalysator. Semi-carbacid wird zur Bindung des flüchtigen Formaldehyds hinzugegeben:



Diese Verbindung wird durch die Trichloressigsäure wieder gespalten:



Der freiwerdende Formaldehyd wird mit Nash's Reagenz zu einem Farbstoff umgesetzt, der photometrisch gemessen werden kann:



Lösungen:

- A) 37,8 mg NADP
123,8 mg DL-Isocitrat
244,4 mg Nicotinsäureamid
20,4 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
- } in 20 ml
Tris-Puffer,
0,05 M, pH 7,5
- B) 222,0 mg Aminopyrin in 20 ml Semicarbacidlösung
(336 mg Semicarbacid x HCl in 100 ml Tris-Puffer
gelöst und mit NaOH auf pH ~ 7 eingestellt), bzw. 193 mg
Morphin x HCl in 20 ml Semicarbacidlösung
- C) 0,2 ml Isocitrat-Dehydrogenase + 1,8 ml Tris-Puffer
(0,05 M, pH 7,5)

Inkubationsansatz = 3 ml:

- 1,0 ml Lösung A
1,0 ml Lösung B
0,1 ml Lösung C
0,3 ml Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,5)
0,6 ml Mikrosomensuspension (≈ 5 mg Protein)

Konzentrationen im Inkubationsansatz:

- Nicotinsäureamid: $33,3 \times 10^{-3}$ M/l
 $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$: $1,7 \times 10^{-3}$ M/l
NADP: $0,8 \times 10^{-3}$ M/l
DL-Isocitrat: $8,0 \times 10^{-3}$ M/l
Semicarbacid
x HCl: $10,0 \times 10^{-3}$ M/l
Aminopyrin: $16,0 \times 10^{-3}$ M/l bzw.

Morphin x HCl: $1,0 \times 10^{-3}$ und 10×10^{-3} M/l
Isocitratdehydrogenase: 0,01 ml / 3 ml-Ansatz

Lösung A, B, C und der Puffer wurden gemischt, 5 min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 0,6 ml Mikrosomensuspension ausgelöst.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Reaktion mit 1 ml 24 %iger Trichloressigsäure gestoppt und der nun aus 4 ml bestehende Ansatz 10 min in Eis stehen gelassen. Danach wurde 10 min bei 10 000 UPM zentrifugiert und 2 ml des Überstandes zu 2 ml Nash's Reagenz gegeben. Diese Mischung wurde auf 40°C erwärmt. Nach Abkühlen wurde die Extinktion bei 412 nm gegen Wasser gemessen. Zur Auswertung der Meßergebnisse diente eine Eichreihe mit Formaldehyd.

IX Chlorpromazinabbau in vitro

Lösungen:

A) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	123,25 mg	} in 20 ml Puffer, pH 7,4
NADP	37,80 mg	
DL-Isocitrat	123,90 mg	

B) Chlorpromazin 1,30 mg / 10 ml Puffer bzw.
Perazin 6,65 mg / 10 ml Puffer

C) Isocitrat-Dehydrogenase 0,2 ml + 1,8 ml Puffer
(frisch herzustellen)

Als Puffer diente Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) oder Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer.

Inkubationsansatz:

1,0 ml Lösung A

1,0 ml Lösung B

0,1 ml Lösung C

0,5 ml Mikrosomensuspension ($\hat{=}$ 2 - 4 mg Protein)

Puffer ad 3,0 ml

Molare Konzentrationen:

DL-Isocitrat : $8,0 \times 10^{-3}$ M/l

NADP: $0,8 \times 10^{-3}$ M/l

Mg²⁺: $8,0 \times 10^{-3}$ M/l (bei Verwendung von
Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer insge-
samt: $9,5 \times 10^{-3}$ M/l)

Chlorpromazin: $1,0 \times 10^{-4}$ M/l

(Perazin: $5,0 \times 10^{-4}$ M/l)

Bei der Sulfoxidation von Chlorpromazin, bzw. in den Vorversuchen der oxydativen Demethylierung von Aminopyrin und Morphin, handelt es sich um eine in vitro Methode, bei der mikrosomale Enzyme in Gegenwart von NADPH₂ und Sauerstoff oxydative Prozesse katalysieren. Die N-Demethylierung von Aminopyrin und Entstehung von Formaldehyd durch Säugetierleber wurde 1954 von La DU et al. beschrieben. Zum Ablauf der Reaktion mit Mikrosomen ist ein NADPH₂-regenerierendes System erforderlich, das sich in der löslichen Zellfraktion befindet. Viele Arbeitsgruppen setzten Glucose-6 -Phosphat und Glucose-6 -Phosphatdehydrogenase ein, die das Nucleotid nach folgender Gleichung reduzieren:



NADP und NAD werden durch zelleigene Enzyme zerstört. Dies kann durch Nicotinamid verhindert werden (MANN und QUASTEL, 1941).

Glucose-6-Phosphat wird ebenfalls von zelleigenen Enzymen angegriffen, deshalb muß es vermehrt zugesetzt oder durch ein anderes System ersetzt werden. Meine Ansätze enthielten, sowohl für den Aminopyrin- als auch für den Chlorpromazinabbau, Isocitrat und Isocitratdehydrogenase, die nach folgendem Schema arbeiten:



Dem verwendeten Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer wurden 10 mg EDTA pro ml zugesetzt, das entspricht einer Konzentration von $2,97 \times 10^{-5}$ M/l EDTA im Inkubationsansatz.

MINDER et al. (1970) führen die relativ starke Sulfoxidbildung, die sie in Inkubationsansätzen mit Blut fanden, hauptsächlich auf die Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen zurück. Außerdem ist bekannt, daß Eisenionen und Licht Chlorpromazin und dessen Metaboliten verändern (COCCIA und WESTERFELD, 1967; GOUCHER et al., 1975; HUANG und SANDS, 1967; USDIN, 1971; GRANT und GREENE, 1972). Um eine Katalyse durch Verunreinigungen mit Eisen möglichst auszuschalten, setzte ich dem Puffer den Komplexbildner zu. Die effektive Stabilität, pK' , beträgt für EDTA bei pH 7,5 mit Fe^{2+} (JANDER / BLASIUS):

$$\text{pK}' = \text{pK} - \log \alpha\text{H}$$

$$\text{pK}' = 14,33 - 2,78 = 11,55$$

mit Mg^{2+} :

$$\text{pK}' = 8,69 - 2,78 = 5,91.$$

Die Konzentration an EDTA im 3 ml-Inkubationsansatz betrug $8,92 \times 10^{-8}$ Mole = $2,97 \times 10^{-5}$ M/l.

Die Konzentration an Magnesiumionen im 3 ml-Ansatz betrug $2,85 \times 10^{-5}$ Mole = $9,5 \times 10^{-3}$ M/l.

Aufgrund der Stabilitätskonstanten und des Konzentrationsunterschiedes zwischen EDTA und Magnesiumionen ist ein Verlust an Magnesiumionen, die für die Reaktion benötigt werden, praktisch unmöglich, auch wenn keine Fe^{2+} -Verunreinigungen vorliegen.

Vor Beginn der Reaktion durch Zugabe von Mikrosomensuspension wurde der Ansatz 5 min bei 37°C vorinkubiert. Um eine möglichst homogene Verteilung der Bestandteile und verbesserte Sauerstoffzufuhr zu erreichen, wurde der Ansatz vor und während der Inkubation geschüttelt. Die Inkubationszeit betrug bis zu 80 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Ammoniak (25 %ig) gestoppt, dem Ansatz 2,5 ml Dichloräthan zugefügt, das Ganze geschüttelt und 5 min bei 10 000 UPM zentrifugiert. Die untere Dichloräthanphase enthält Chlorpromazin und dessen Metaboliten. Sie wurde abgesaugt und in ein Reagenzglas gegeben. Die obere Phase wurde nochmals mit 2,5 ml Dichloräthan extrahiert und zentrifugiert und die neue untere Phase ebenfalls abgesaugt und zu der ersten hinzugegeben. Diese Lösung wurde im Rotavapor bei $25 - 30^{\circ}\text{C}$ unter Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 0,2 ml eines Chloroform-Methanol-(2+1)-Gemisches aufgenommen und quantitativ auf eine Dünnschichtplatte in Form einer ca. 1,5 cm langen

Linie aufgetragen. Zum Rückstand wurden nochmals 0,1 ml des Lösungsmittelgemisches gegeben und diese Lösung ebenfalls quantitativ aufgetragen und chromatographiert.

Die Beendigung der Reaktion durch 5 ml siedenden Äthanol ($\sim 70^{\circ}\text{C}$) und Extraktion von Chlorpromazin und seinen Metaboliten mit Äthanol ergab keine reproduzierbaren quantitativ und qualitativ auswertbaren Ergebnisse.

X Kontrollwerte

Sie wurden auf drei verschiedene Arten ermittelt:

- 1) Zum Ansatz wurden zu Beginn der Inkubation, vor der Mikrosomenzugabe, bereits 0,5 ml Ammoniak (25 %ig) gegeben.
- 2) Die Inkubation erfolgte ohne Mikrosomenzusatz, wobei das fehlende Volumen mit einer entsprechenden Puffermenge ausgeglichen wurde.
- 3) Die Inkubation erfolgte bei 0°C (in Eis).

XI Qualitative Analyse

Hinweis auf Chlorpromazin und seine Metaboliten ergeben sich durch

- 1) Anwendung von Sprühreagenzien und 2 - 3 min langes Erhitzen auf 100°C im Trockenschrank,
- 2) Vergleich der RF-Werte der Metaboliten mit denen authentischer Substanzen,
- 3) Rechromatographie der aus UV-absorbierenden Banden eluierten (in Chloroform-Methanol-Gemisch (2+1, v/v)) Sub-

stanzen. Das Kieselgel wurde durch Zentrifugation (10 min bei 38 000 g) entfernt, der Überstand im Vakuum eingeengt und der Rückstand in wenig Chloroform-Methanol-Gemisch aufgenommen.

- 4) Aufnahme von UV-Spektren zur Unterscheidung der sulf-oxidierten von anderen Metaboliten und unverändertem Chlorpromazin aus den abgeschabten und eluierten Banden nach Abtrennung des Kieselgels.

XII Quantitative Analyse

Ansätze mit radioaktivem (^{35}S)-Chlorpromazin und (^{35}S)-Pera-zinmalonat wurden mit einem Dünnschichtscanner oder einem Flüssigkeitsscintillator ausgewertet. Zur Messung im Flüssigkeitsscintillator wurden die einzelnen Banden abgeschabt, in Zählgläschen gefüllt und mit 3 ml des Chloroform-Methanol-Gemisches geschüttelt. Nach Zugabe von je 15 ml der Scintillatorlösung wurde noch einmal 10 min geschüttelt und die Proben nach Abkühlen auf 4°C je 10 min lang gezählt.

XIII Bestimmung der Wiederfindungsraten von CPZ, CPZ-SO und CPZ-Nor₁

Radioaktive Banden von CPZ, CPZ-SO und CPZ-Nor₁ aus mehreren Inkubationsansätzen wurden gesammelt, abgeschabt und die Substanzen durch Schütteln mit Chloroform-Methanol (2+1, v/v) weitgehend aus dem Kieselgel herausgelöst. Das Kieselgel wurde abzentrifugiert (10 min bei 38 000 g). Von den Überständen

wurde je 6 mal 1,0 ml entnommen. Je 2 mal 1,0 ml wurde mit 1,5 ml Scintillatorlösung gut gemischt und gezählt. Diese Ergebnisse dienten als Ausgangswert ($\approx 100\%$). Die restlichen Proben wurden unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden mit 1 ml Lösung A, 0,1 ml B und inaktivem Chlorpromazin in 10^{-4} molarer Konzentration in Puffer ad 2,9 ml Gesamtvolumen versetzt. Nach Schütteln bei 37°C wurden 0,5 ml Ammoniak (25 %ig), 2,5 ml Dichloräthan und dann erst 0,1 ml Mikrosomensuspension zugegeben, um eine enzymatische Reaktion zu verhindern. Die Extraktion erfolgte wie beschrieben. Vor dem Einengen wurden die Lösungen halbiert. Ein Teil wurde zur Aktivitätsmessung in Zählgläschen mit Scintillator gefüllt, die andere Hälfte im Rotavapor eingengt und die Rückstände chromatographiert. Die Banden wurden abgeschabt, in 3 ml Chloroform-Methanol eluiert, mit Scintillatorlösung geschüttelt und ihre Aktivität bestimmt.

XIV Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Michaeliskonstante entspricht der Konzentration eines Substrates, durch die eine enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft und gibt damit in gewisser Weise die Affinität des Substrates zu dem Enzym wieder. Der K_m -Wert unterscheidet sich von K_s , der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes, die die Gleichgewichtsbedingungen zwischen Enzym, Substrat und Enzym-Substrat-Komplex beschreibt. Wenn die Zerfallsrate des Komplexes, gegenüber der Komplexbildungsgeschwindigkeit, so klein ist, daß sie vernachlässigt werden kann, dann wird $K_m = K_s$.

Der Vmax-Wert reflektiert die Zerfallsrate des Enzym-Substrat-Komplexes und stellt die maximale Geschwindigkeitskonstante dar. Der Vmax-Wert aus 60 min-Inkubationen unterscheidet sich naturgemäß deutlich von der Anfangsgeschwindigkeit. Deshalb wurde bei der Beschriftung der Ordinaten bei den Substratabhängigkeitsversuchen die Geschwindigkeit pro 30 min angegeben.

Nach WILKINSON (1961) sollte die Substratkonzentration bei kinetischen Studien zwischen $\frac{1}{3} K_m$ und $3 K_m$ variieren, nach CLELAND (1967) zwischen $\frac{1}{5}$ und $5 K_m$. Zur Anwendung der Michaelis-Menten-Theorie muß die Substratkonzentration stets wesentlich größer als die Enzymkonzentration sein.

Zur Bestimmung der apparenten Michaeliskonstante wurden die Substratabhängigkeiten geprüft, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit v als Produktbildung in der Zeiteinheit gemessen wurde. Bei Auftragung von v gegen S in ein Koordinatensystem resultiert eine Kurve entsprechend der Gleichung

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

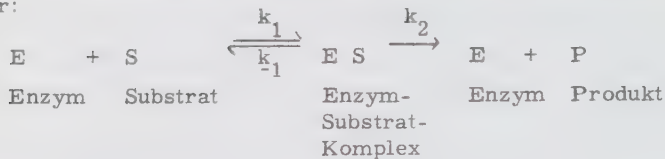
$V_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

S = Substratkonzentration

K_m = Michaeliskonstante

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{nach BRIGGS und HALDANE, 1925})$$

k_1 , k_{-1} und k_2 stellen folgende Geschwindigkeitskonstanten dar:



Wird k_2 vernachlässigbar klein, gilt

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (\text{nach MICHAELIS-MENTEN}).$$

Zur graphischen Darstellung der kinetischen Konstanten K_m und $V_{\max}$ wird die Kurvengleichung in eine Geradengleichung umgewandelt, indem man sie in reziproker Form schreibt:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S}$$

Die entsprechende Gerade im Koordinatensystem $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{S}$ hat ihren Schnittpunkt mit der Ordinate bei $\frac{1}{V_{\max}}$. Der Schnittpunkt auf der Abszisse ist gleich $-\frac{1}{K_m}$. Diese Bestimmungsmethode hat folgende Nachteile:

Eine Abweichung des gemessenen v -Wertes hat bei kleiner Substratkonzentration einen größeren Einfluß auf die Lage der Geraden als bei großen Substratkonzentrationen. Außerdem ist die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit bei kleiner Substratkonzentration einem größeren prozentualen Fehler unterworfen. Deshalb wurden in der Literatur andere graphische Bestimmungsmethoden manchmal vorgezogen. Die Methode von HOFSTEE mißt z.B. dem v -Wert bei kleiner Substratkonzentration geringere Bedeutung bei, als dies bei der beschriebenen Lineweaver-

Burk-Methode der Fall ist. Hier wird v gegen $\frac{v}{S}$ aufgetragen nach der Gleichung $v = V_{\max} - K_m \times \frac{v}{S}$, ebenfalls aus der Ursprungsgleichung abgeleitet.

1973 veröffentlichten EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN eine neue graphische Bestimmungsmethode für kinetische Parameter. Mit ihrer Hilfe ist eine Bestimmung der Konstanten ohne Berechnung einfach und rasch möglich. Abweichende Beobachtungen werden leicht identifiziert und somit die Qualität der Arbeit leicht erkannt. Die Autoren wandelten die Michaelis-Menten-Gleichung ebenfalls in eine Geradengleichung um:

$$\frac{V_{\max}}{v} - \frac{K_m}{S} = 1$$

In einem Koordinatensystem $V_{\max}$ gegen K_m liegen die Schnittpunkte der entsprechenden Geraden bei $-S$ auf der K_m -Achse und bei v auf der $V_{\max}$ -Achse. In der praktischen Anwendung werden die negativen S -Werte auf die K_m -Achse, die dazugehörigen v -Werte auf die $V_{\max}$ -Achse aufgetragen und die zusammengehörenden v - und S -Werte durch Geraden miteinander verbunden. Diese Geraden haben einen gemeinsamen Schnittpunkt, dessen Koordinaten dem gesuchten $V_{\max}$ - und K_m -Wert entsprechen.

Um sicherzustellen, daß nicht durch ungenaues Auftrennen der Metaboliten auf dem Dünnschichtchromatogramm verfälschte Ergebnisse erzielt wurden, erfolgte die Bestimmung des K_m -Wertes in verschiedenen Fließmitteln.

Ergebnisse

I Vorversuche

Bei Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen konnte eine Demethylierung von Aminopyrin und Morphin nachgewiesen werden. Mit Mikrosomen aus Rattendünndarmmukosa konnte dagegen keine entsprechende Reaktion festgestellt werden (siehe Abb. 1, 2, 3). Mit Nash's Reagenz lassen sich bis zu ca. $0,05 \mu\text{Mol HCHO/ml/10 min}$ nachweisen (siehe Eichreihe). Der 3-ml-Ansatz enthielt $4,8 \times 10^{-5}$ Mole Aminopyrin. Die Hälfte wurde zur Messung eingesetzt.

Das Volumen der Meßlösung betrug 4 ml, das heißt, die Meßlösung enthielt $0,6 \times 10^{-5}$ Mole/ml. Bei der Demethylierung liefert 1 Mol Aminopyrin 2 Mole Formaldehyd. 100 %ige Demethylierung würde folglich eine Konzentration von $1,2 \times 10^{-5}$ M Formaldehyd/ml ergeben. Die Versuche ergaben, daß die Demethylierung bei 1 % oder darunter liegt. Damit erweist sich die Nash-Reaktion zum sicheren Nachweis enzymatischer Oxidationsprozesse im Rattendarm als ungeeignet.

II Identität und Reinheit der Vergleichssubstanzen

Die Dünnschichtchromatogramme der Vergleichssubstanzen, CPZ x HCl, CPZ-SO, CPZ-SO₂, CPZ-Nor₁, CPZ-SO-Nor₁, CPZ-SO-Nor₂, CPZ-NO, CPZ-SO-NO und 7-OH-CPZ, ergaben RF-Werte, die mit denen von TURANO und TURNER (1973) gute Übereinstimmung zeigten. Unter UV-Licht erwiesen sich

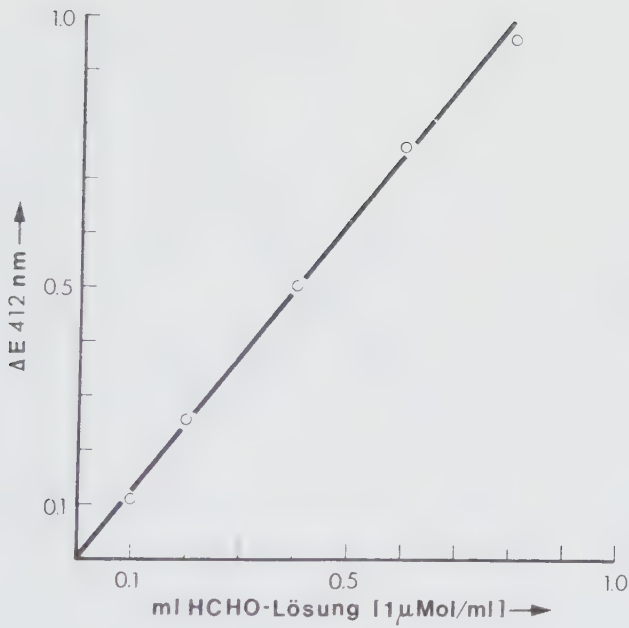
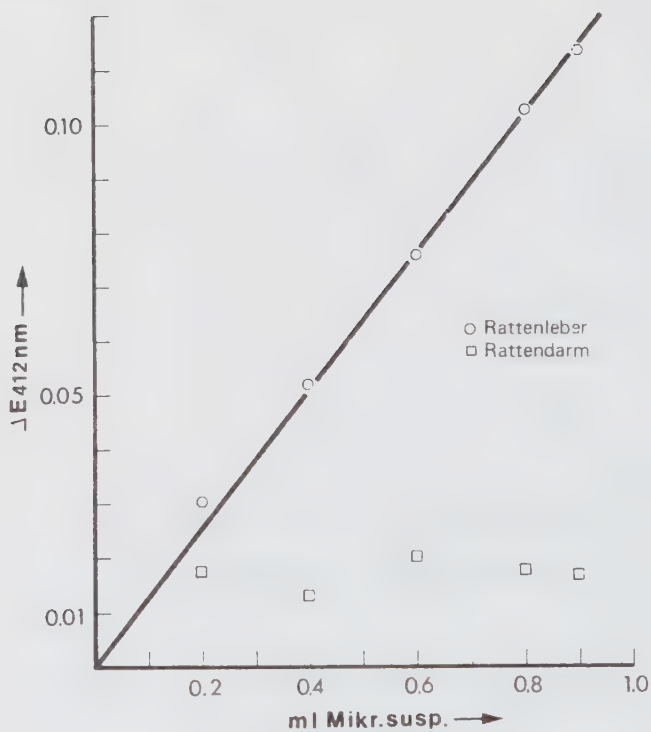


Abb. 1

Eichreihe zur Demethylierung von Aminopyrin



Abh 2

Demethylierung von Aminopyrin: Enzymabhängigkeit mit Mikrosomen von Rattenleber und Rattendarm

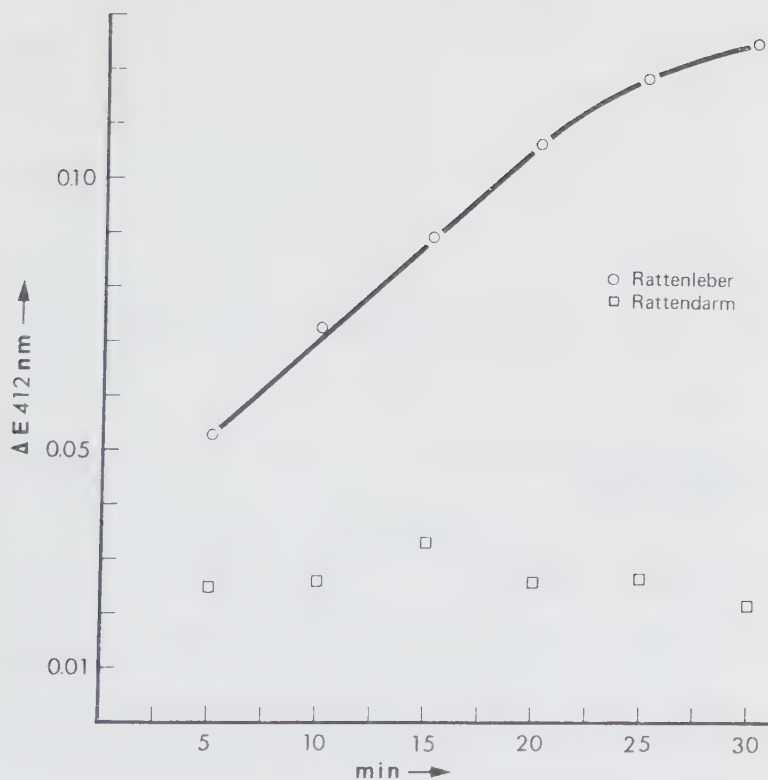


Abb. 3

Demethylierung von Aminopyrin: Zeitabhängigkeit mit Mikrosomen von Rattenleber und Rattendarm

die entsprechenden Flecke der Fluoreszenzlöschung als einheitlich, mit Ausnahme der Flecke von CPZ-SO-NO und 7-OH-CPZ, wobei CPZ-SO-NO zu ca. 50 % in CPZ-NO und CPZ-SO zerfallen war, während 7-OH-CPZ geringere Verunreinigungen aufwies. Die UV-Spektren der sulfoxidierten Vergleichssubstanzen zeigten die charakteristischen Maxima bei 238,5; 274; 299 und 342 nm im Gegensatz zum Spektrum von Chlorpromazin und dem der nicht sulfoxidierten Derivate, deren Maxima bei 207,5; 254 und 307 nm liegen. Zur Reinheitsprüfung der radioaktiv-markierten Substanzen (^{35}S)-CPZ und (^{35}S)-Perazin siehe Abbildung des Dünnschichtscanners 4 und 4a.

III Zählausbeute

Das verwendete (^{35}S)-markierte Chlorpromazin hatte eine spezifische Aktivität von 7,4 mCi/mMol (HWZ: 87,2 Tage). Nach der Zerfallstabelle für Schwefel 35 betrug die spezifische Aktivität am Tag der Bestimmung (8 Tage nach der Synthese) $7,4 \text{ mCi/mMol} \times 0,938 = 6,94 \text{ mCi/mMol}$. Das entspricht $15,41 \times 10^9 \text{ dpm}$. Vier Messungen mit $1,4 \times 10^{-4} \text{ mg } (^{35}\text{S})\text{-CPZ}$ ergaben folgende Werte:

5841,3 cpm	$\hat{=}$	96,11 %
6123,3 cpm	$\hat{=}$	100,75 %
6314,7 cpm	$\hat{=}$	103,90 %
<u>6196,2 cpm</u>	$\hat{=}$	<u>101,95 %</u>
24475,5 cpm : 4 =		402,71 % : 4 =
m = 6118,875 cpm		100,68 %
(100 % $\hat{=}$ 6077,7 cpm)		

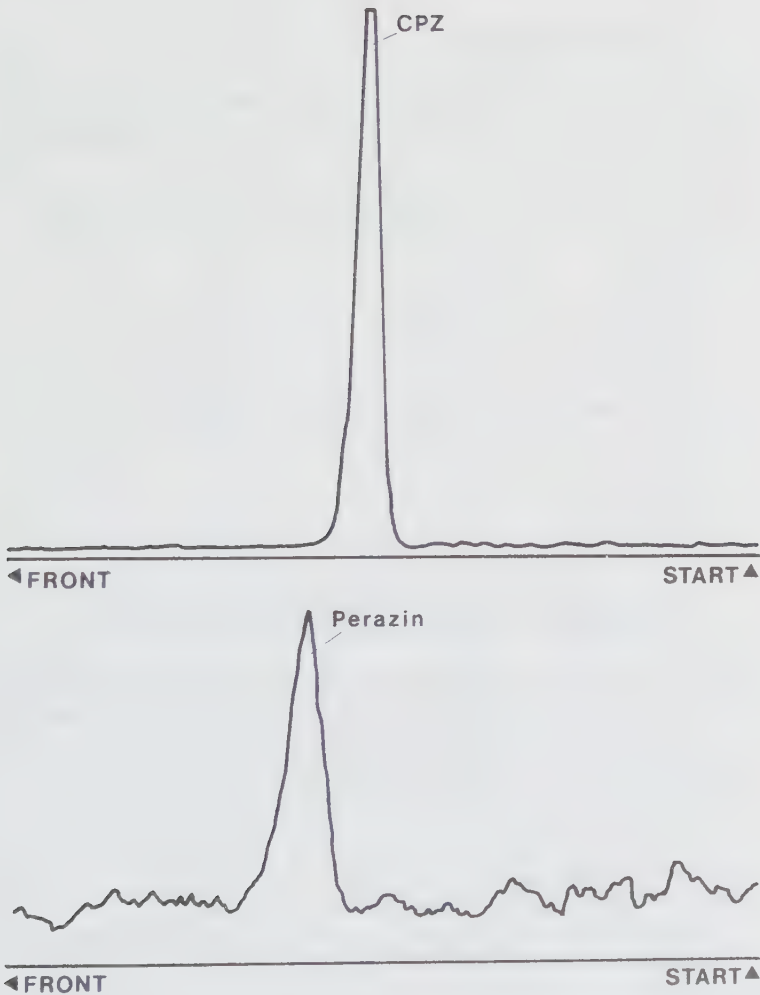


Abb. 4 und 4 a:

Dünnschichtchromatographische Reinheitsprüfung des (^{35}S)-Chlorpromazin und des (^{35}S)-Perazin

IV Wiederfindungsrate

Während bei der Extraktion nur ein relativ geringer Teil verloren geht, wird aus Kieselgel nur etwa die Hälfte der aufgetragenen Substanz eluiert.

Wiederfindung nach Extraktion aus dem Inkubationsansatz:

CPZ	:	95 %
CPZ-SO	:	99 %
CPZ-Nor ₁	:	96 %

Wiederfindung nach Lösen aus der Dünnschichtplatte:

CPZ	:	53 %
CPZ-SO	:	49 %
CPZ-Nor ₁	:	51 %

V Vergleich der Methoden zur Radioaktivitätsmessung

Ein Vergleich der Zählergebnisse vom Flüssigkeitsscintillator und vom Dünnschichtscanner bei 40 Proben zeigte, daß die Ergebnisse des Flüssigkeitsscintillators durchschnittlich 2,5 % über denen des Dünnschichtscanners liegen.

VI Cytochrom-P₄₅₀-Bestimmung

In Mikrosomensuspensionen, gewonnen durch Differentialzentrifugation:

Rattenleber: $0,84 \pm 0,07$ nM/mg Protein, siehe Abb. 5,

Rattendünndarmmukosa: nicht meßbar, siehe Abb. 5a,

Meerschweinchenleber: $1,2 \pm 0,2$ nM/mg Protein, siehe Abb. 6,
(0,24 nM Cytochrom b₅/mg Protein),

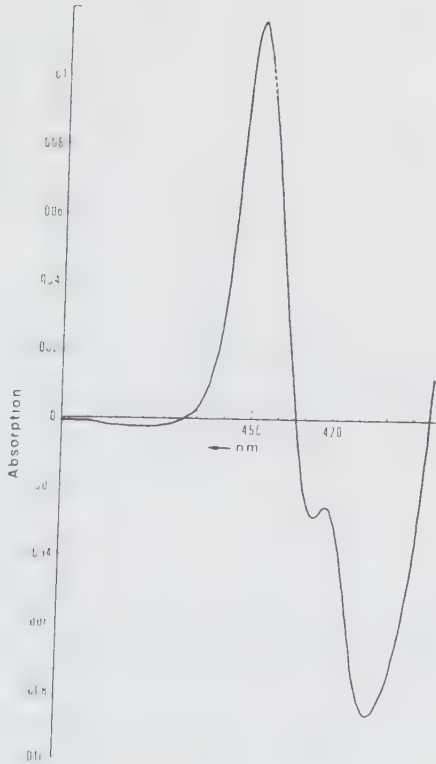


Abb. 5

Cytochrom-P₄₅₀ in Rattenlebermikrosomen

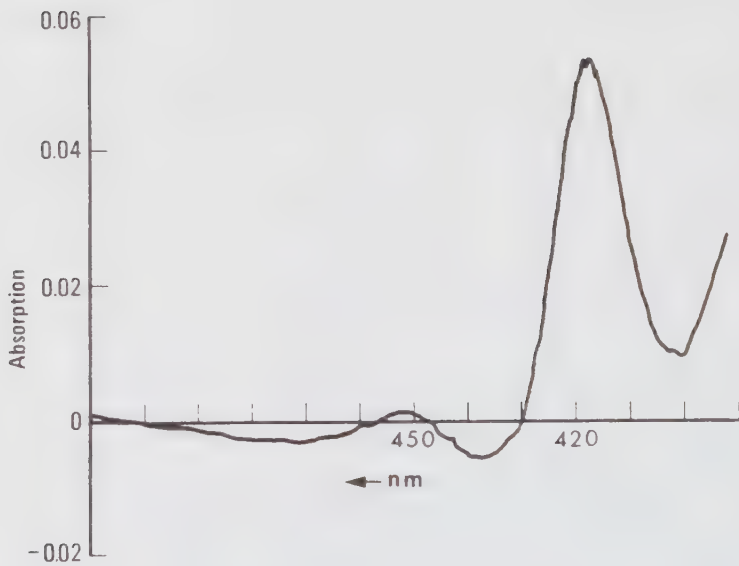


Abb. 5a

Cytochrom-P₄₅₀ in Rattendarmmikrosomen

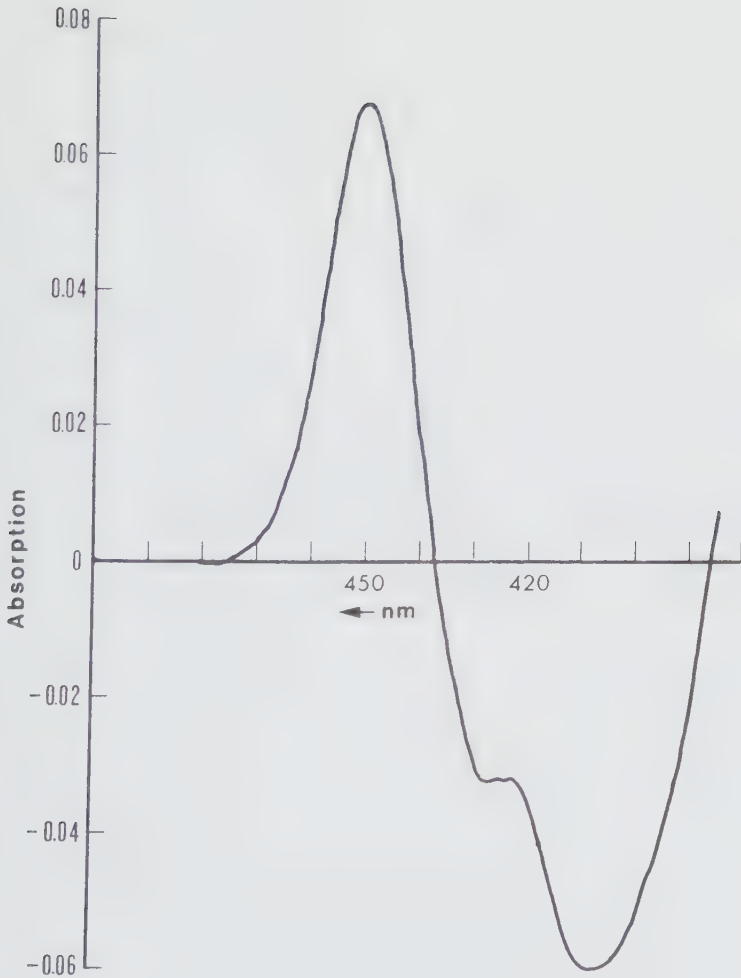


Abb. 6

Cytochrom-P₄₅₀ in Meerschweinchenlebermikrosomen

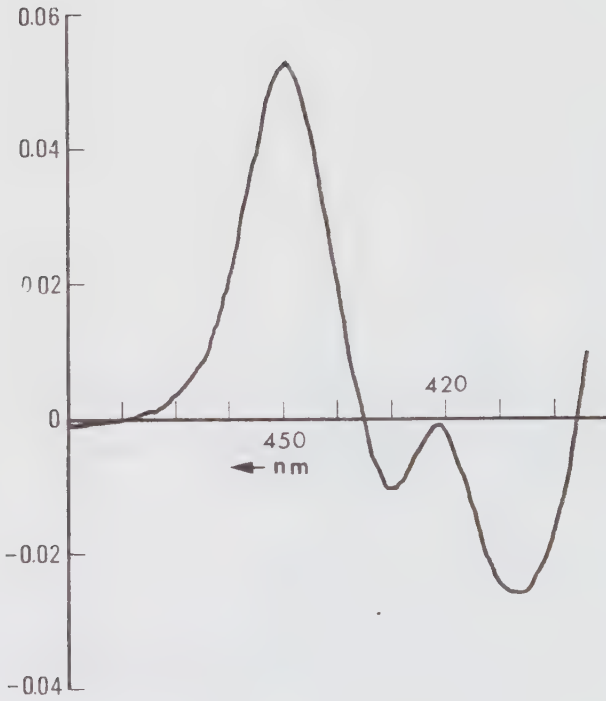


Abb. 6a

Cytochrom-P₄₅₀ in Meerschweinchendarmmikrosomen

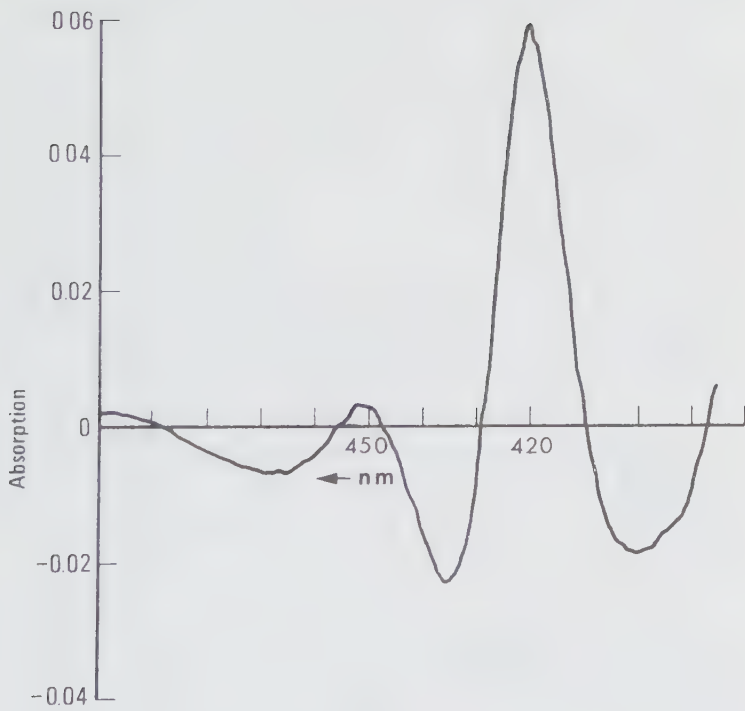


Abb. 7

Cytochrom-P₄₅₀ in Darmmikrosomen von Menschen

Meerschweinchendünndarmmukosa: $0,16 \pm 0,02$ nM/mg, siehe Abb. 6a ($0,12$ nM Cytochrom b_5 /mg Protein). Bei einer etwas modifizierten Gewebeaufarbeitung lag der Gehalt an Cytochrom- P_{450} allerdings höher. HOENSCH et al. (1975) konnten nachweisen, daß der P_{450} -Gehalt der Mikrosomen in den oberen Mukosaschichten höher ist als in den darunterliegenden. In Anlehnung an die methodischen Angaben von DIETSCHY et al. (1965) schabte ich nur die oberste Schicht der Darmmukosa ab und konnte daraus eine Mikrosomensuspension mit $0,24$ nM/mg Protein gewinnen. Um die Zahl der Versuchstiere gering zu halten, schabte ich bei späteren Versuchen die Mukosa stärker ab. So erhielt ich mehr enzymatisch aktives Material pro Versuchstier, wenn auch mit etwas geringerem Cytochrom- P_{450} -Gehalt.

Menschliche Dünndarmmukosa: $0,03 \pm 0,04$ nM/mg Protein, siehe Abb. 7.

In Mikrosomensuspensionen, gewonnen durch Ca^{2+} -Fällung (KAMATH et al., 1971):

Rattenleber: $0,36 \pm 0,05$ nM/mg Protein, siehe Abb. 8.

In Mikrosomen aus Rattendünndarmmukosa ließ sich Cytochrom- P_{450} nur nachweisen, wenn der gesamte Herstellungsvorgang unter CO-Begasung erfolgte. Unter diesen Bedingungen ergibt sich ein Gehalt von $0,09 \pm 0,02$ nM/mg. Bei Herstellung unter Stickstoff war die Konzentration $0,02 \pm 0,01$ nM/mg Protein, siehe Abb. 9 und 9 a.

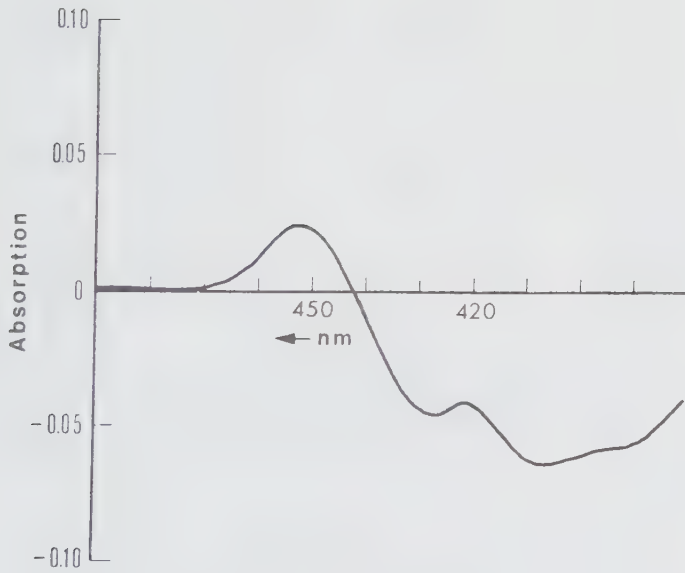


Abb. 8

Cytochrom -P₄₅₀ in Rattenlebermikrosomen, gewonnen durch
Ca²⁺-Fällung

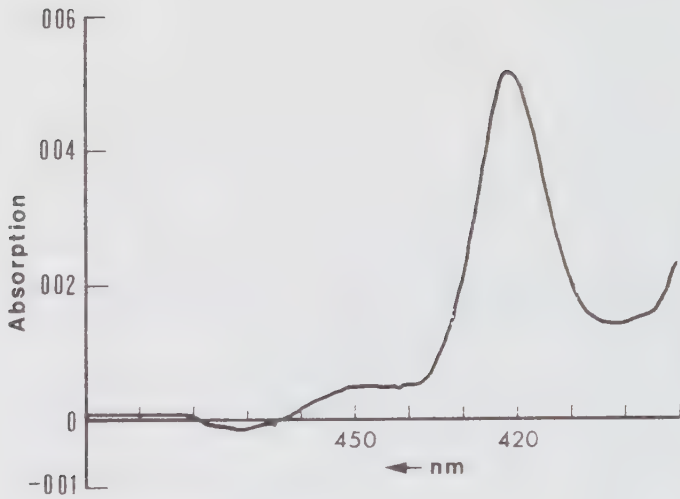


Abb. 8a

Cytochrom-P₄₅₀ in Rattendarmmikrosomen, gewonnen durch
Ca²⁺-Fällung

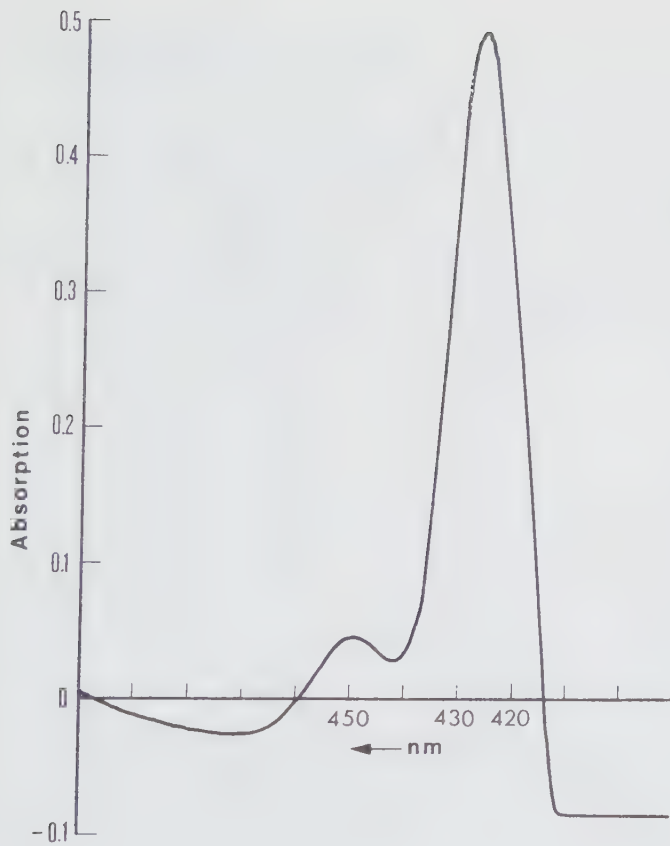


Abb. 9

Cytochrom-P₄₅₀ in Rattendarmmikrosomen, unter Kohlenmonoxid-
begasung hergestellt

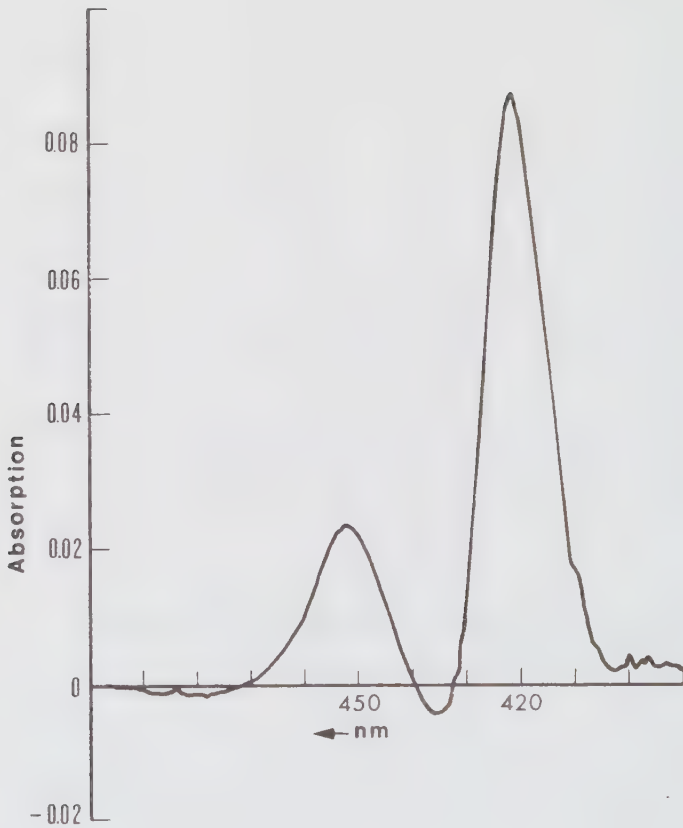


Abb. 9a

Cytochrom-P₄₅₀ in Rattendarmmikrosomen, unter Stickstoff-
begasung hergestellt

VII Haltbarkeit der Mikrosomen

Die Bestimmung des Cytochrom-P₄₅₀-Gehaltes bei Mikrosomen-suspensionen aus Meerschweinchendünndarmmukosa nach unterschiedlicher Lagerungsdauer bei - 25°C ergab folgende Werte:

Alter der Mikrosomen-suspensionen in Tagen	Cytochrom-P ₄₅₀ -Gehalt in nMol/mg Protein
1	0,13
1	0,07
3	0,13
3	0,22 [†]
5	0,15
5	0,16
7	0,12
7	0,17
60	0,15
60	0,13 ^{††}
60	0,07 ^{††}
330	nicht meßbar

([†]: Zur Mikrosomengewinnung wurde nur die oberste Mukosaschicht eingesetzt.

(^{††}: Bei den beiden Werten handelt es sich um Suspensionen aus demselben Herstellungsgang. Durch einmaliges Auftauen während der Lagerungszeit und erneutes Einfrieren kam es zu einem geringeren Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt von 0,07 nM/mg gegenüber 0,13nM/mg bei 2-monatiger Lagerung ohne Unterbrechung.)

Über einen Zeitraum von 2 Monaten ließ sich kein Zusammenhang zwischen Dauer der Lagerung und Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt feststellen. Nach einem Jahr hatten die Suspensionen ihre enzymatische Aktivität allerdings vollständig verloren. Die Schwankungen in den Meßergebnissen beruhen wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Behandlung der Dünndarmmukosa, denn das Abschaben der Mukosa-Schichten ist in der Praxis nicht immer völlig gleich.

Um festzustellen, ob das erste Einfrieren zu Verlusten führt, wurden die Differenzspektren der reduzierten Kohlenmonoxid-Komplexe von frischen Mikrosomensuspensionen mit denen eingefrorener verglichen:

<u>Lagerungsdauer</u>	<u>Extinktion</u>
Messung unmittelbar nach der Herstellung	0,044
2 1/2 Std. bei - 25°C	0,041
3 Tage bei -25°C	0,050

(Als Meßlösung diente stets eine Verdünnung von 0,5 ml Mikrosomensuspension + 4,5 ml Puffer.)

Bei einmaligem Einfrieren tritt also keine Abnahme an Cytochrom-P₄₅₀ auf. Auftauen und erneutes Einfrieren führte dagegen zu einem erheblichen Verlust an Cytochrom-P₄₅₀ (ca. 50 %).

Neben der Cytochrom-P₄₅₀-Bestimmung wurden auch Metabolisierungsversuche mit frischen und einen Tag lang eingefro-

renen Mikrosomen durchgeführt. Zwischen den Umsatzraten der beiden Proben bestand kein Unterschied.

VIII Sulfoxidation und Demethylierung von Chlorpromazin und Perazin

Bei Versuchen mit Rattendarmmikrosomen zeigten sich zwischen Inkubationen bei 37°C und Kontrollwerten keine Unterschiede, sowohl mit Chlorpromazin als auch mit Perazin. Das gleiche Ergebnis erzielte ich auch mit Mikrosomen, die unter Stickstoff hergestellt worden waren, siehe Abb. 10a, b, c, d und e.

Versuche mit Meerschweinchendarmmikrosomen ergaben deutliche Umsatzdifferenzen zwischen Inkubationen bei 37°C und Kontrollwerten, das heißt, die eingesetzte Mikrosomensuspension war enzymatisch aktiv. Es entstanden hauptsächlich Chlorpromazinsulfoxid und demethyliertes Chlorpromazin, siehe Abb. 11 und 11 a.

Der Umfang der Metabolitenbildung hing von der eingesetzten Substratkonzentration ab. Bei Inkubationen mit Meerschweinchendarmmikrosomen in dem Bereich von 10^{-4} - 10^{-6} M/l CPZ lag die Sulfoxidbildung etwa zwischen 7 und 4 %. Bei diesen Angaben handelt es sich um die Differenzen zwischen Kontrollwert und Inkubationsergebnis. Bedingt durch unterschiedliche Enzymkonzentrationen und Inkubationsdauer geben die Prozentzahlen nur die Größenordnungen an.

Bei geringerer Substratkonzentration ($< 10^{-6}$ M/l) bildete sich mehr Sulfoxid als demethyliertes Chlorpromazin, bei Substratkonzentrationen um 10^{-4} M/l war die Menge der beiden Meta-

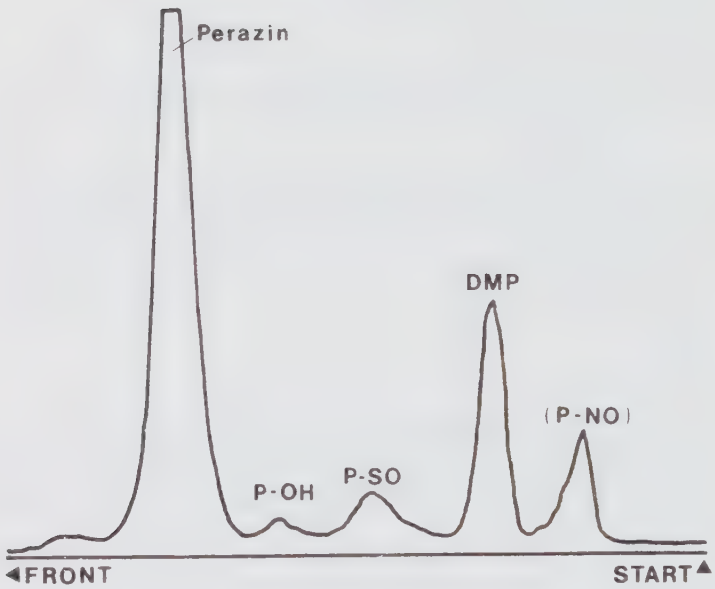


Abb. 10a

Radiochromatogramm von (^{35}S)-Perazin nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen

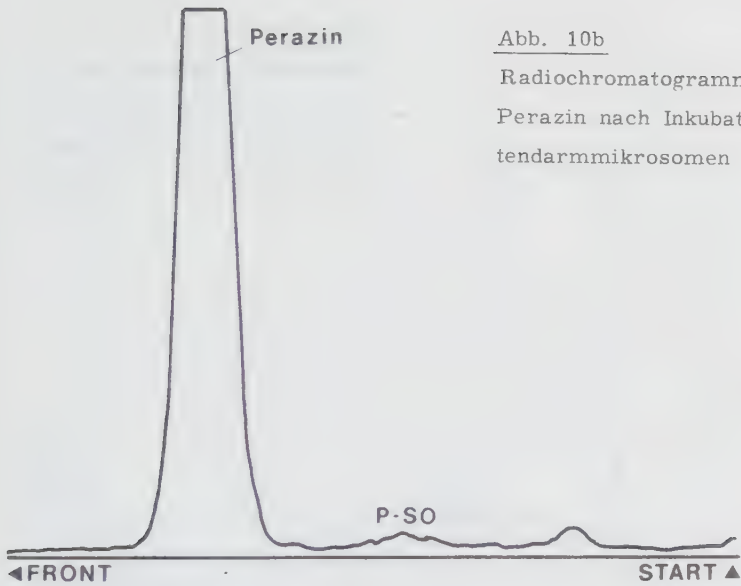


Abb. 10b

Radiochromatogramm von (^{35}S) -
Perazin nach Inkubation mit Rat-
tendarmmikrosomen

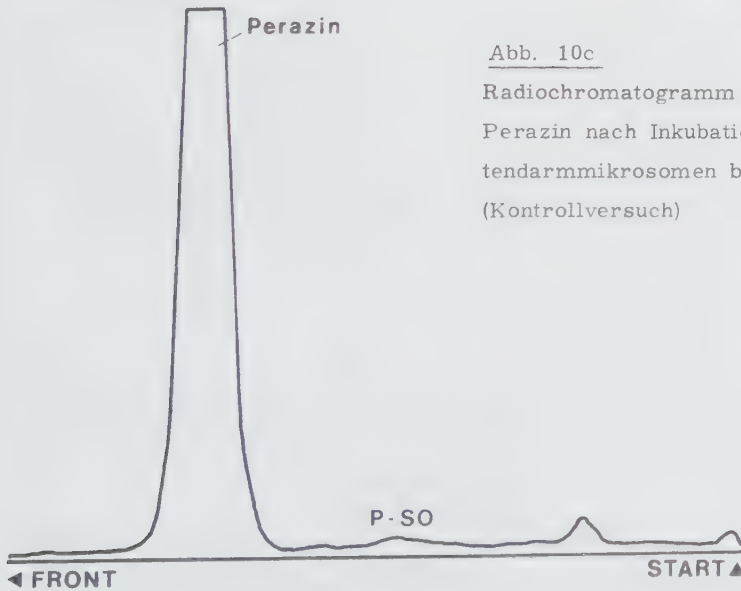


Abb. 10c

Radiochromatogramm von (^{35}S) -
Perazin nach Inkubation mit Rat-
tendarmmikrosomen bei 0°C
(Kontrollversuch)

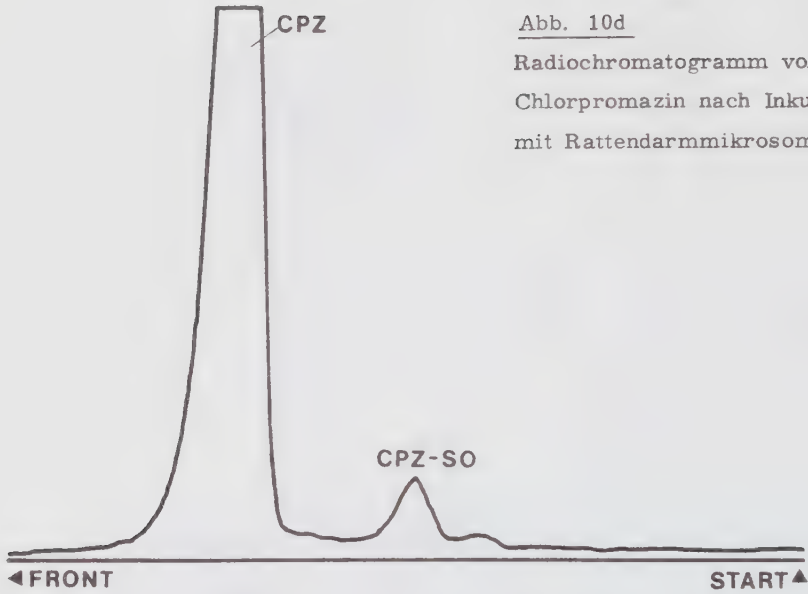


Abb. 10d

Radiochromatogramm von (^{35}S) -
Chlorpromazin nach Inkubation
mit Rattendarmmikrosomen

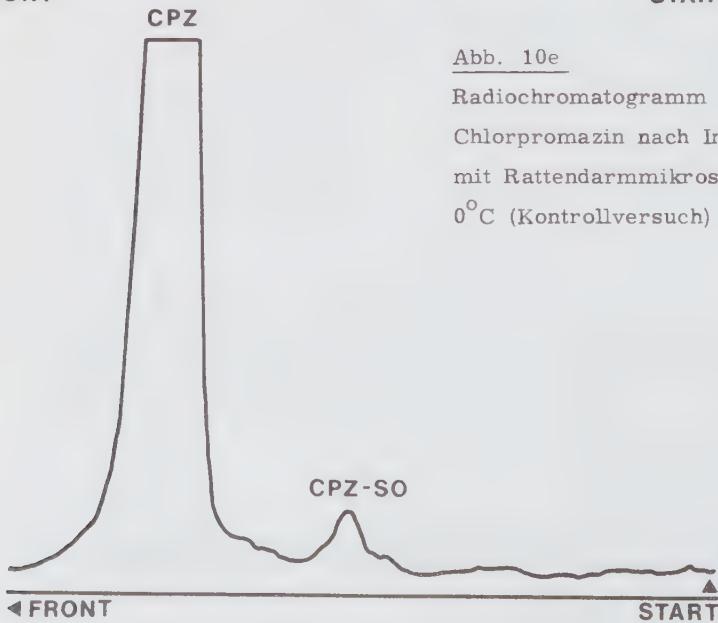


Abb. 10e

Radiochromatogramm von (^{35}S) -
Chlorpromazin nach Inkubation
mit Rattendarmmikrosomen bei
 0°C (Kontrollversuch)

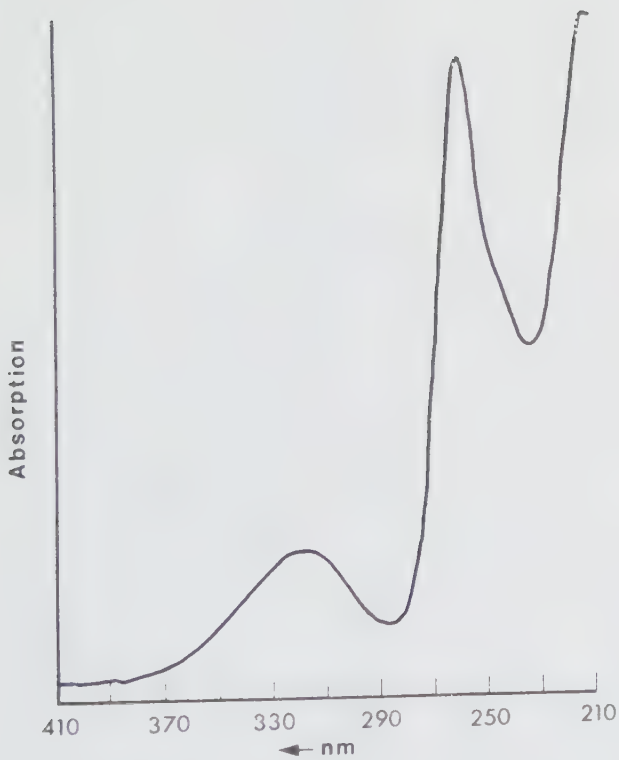


Abb. 11

UV-Spektrum der Monodesmethyldichlorpromazin-Vergleichssubstanz



Abb. 11'

UV-Spektrum des monodemethylierten Chlorpromazinmetaboliten aus Inkubationen mit Meerschweinchendarmmikrosomen

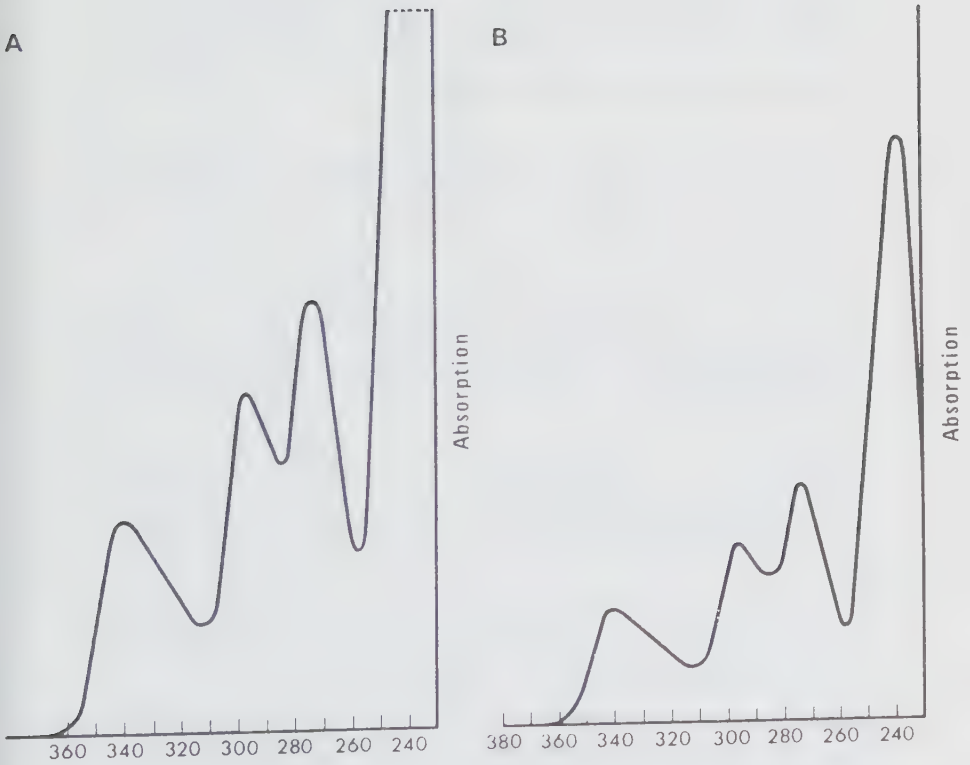


Abb. 11a

UV-Spektrum des Chlorpromazinsulfoxids

A: Vergleichssubstanz

B: Metabolit aus Inkubationen mit Meerschweinchendarmmikrosomen

boliten etwa gleich groß, bei mehr als 10^{-4} M/l Chlorpromazin im Ansatz bildete sich mehr demethyliertes Chlorpromazin als Chlorpromazinsulfoxid. Außerdem entstanden zwei weitere Metaboliten, deren Konzentration jedoch so gering war, daß eine Identifizierung nicht möglich war (Abb. 12 a, b, c, d, e, f).

Entsprechende Versuche mit Lebermikrosomen von Ratte und Meerschweinchen ergaben eine stärkere Metabolitenbildung als bei Darmmikrosomen (siehe Abb. 13a und b).

Außerdem war die Demethylierung stets ausgeprägter als die Sulfoxidation, auch bei kleiner Substratkonzentration (1×10^{-5} M/l). Ebenfalls stärker als die Sulfoxidbildung war die Entstehung eines dritten Metaboliten, bei dem es sich wahrscheinlich um das demethylierte Sulfoxid oder um das Stickoxid handelt.

Aufgrund des raschen Zerfalls bei der Rückgewinnung an der Luft, konnte die Verbindung nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

Bei Inkubation mit Lebermikrosomen bildete sich auch 7-Hydroxy-Chlorpromazin. Dieser Metabolit tauchte allerdings bei den verschiedenen Versuchen nur unregelmäßig auf.

Direkte Vergleiche zwischen Leber- und Darminkubation führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Mit Lebermikrosomen ergab sich, bezogen auf den Proteingehalt, 2 - 7-fach stärkere Sulfoxidation als mit Darmmikrosomen.

In Abwesenheit von NADP im Inkubationsansatz war die Metabolitenbildung sowohl mit Leber- als auch mit Darmmikrosomen reduziert (siehe Abb. 14 a, b).

Nach Inkubationen mit menschlichen Dünndarmmikrosomen war

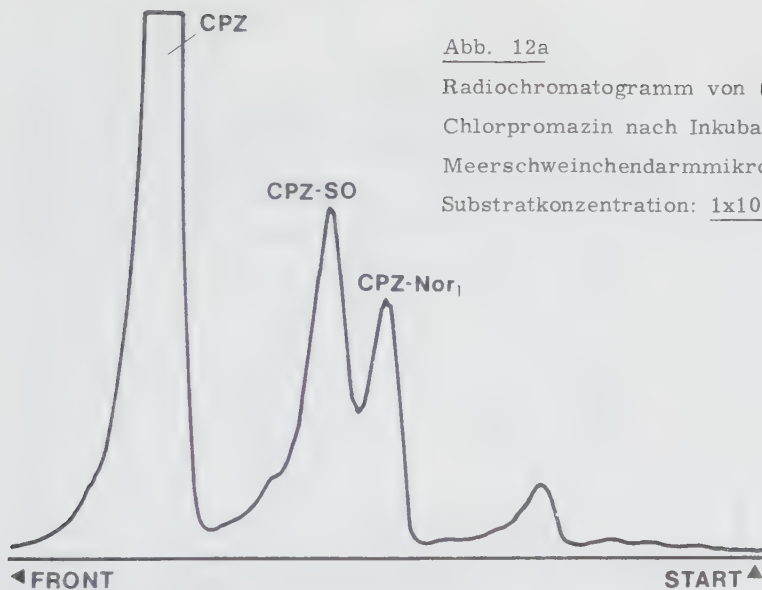


Abb. 12a

Radiochromatogramm von (³⁵S)-
Chlorpromazin nach Inkubation mit
Meerschweinchendarmmikrosomen,
Substratkonzentration: 1×10^{-5} M/l

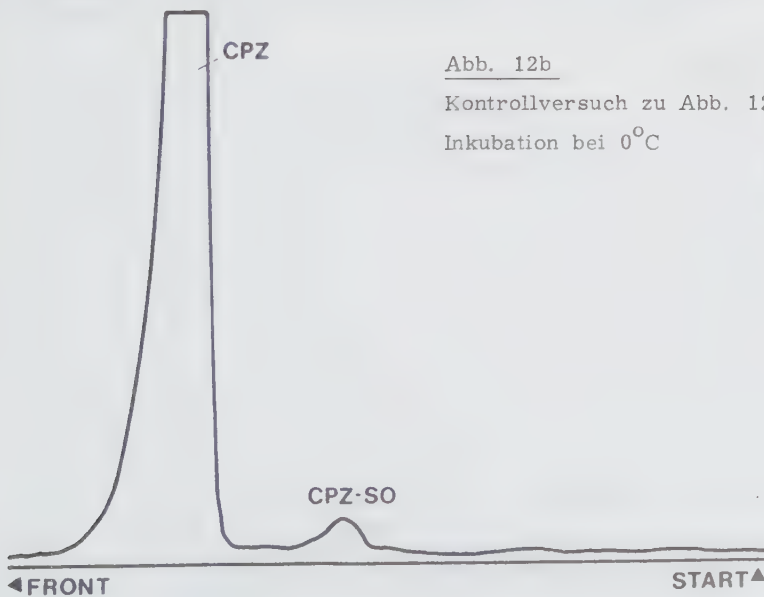


Abb. 12b

Kontrollversuch zu Abb. 12a,
Inkubation bei 0°C

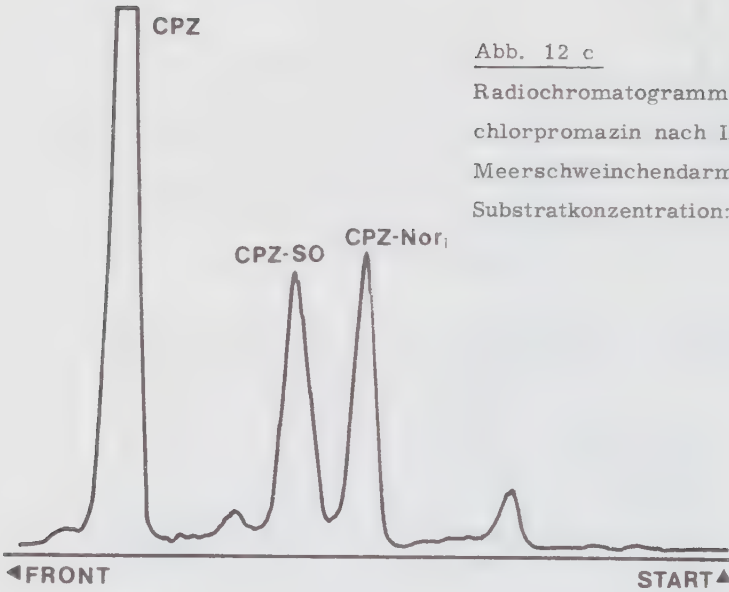


Abb. 12 c

Radiochromatogramm von (^{35}S)-
chlorpromazin nach Inkubation mit
Meerschweinchendarmmikrosomen,
Substratkonzentration: $9 \times 10^{-5} \text{ M/l}$

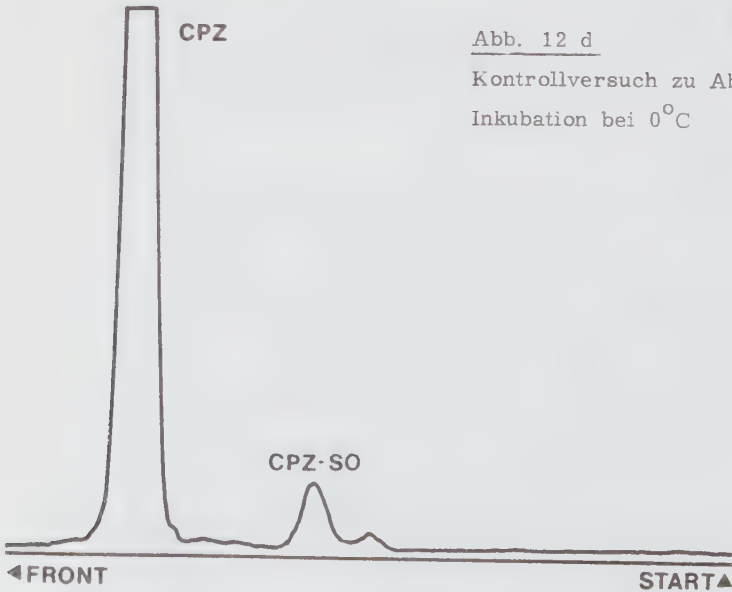


Abb. 12 d

Kontrollversuch zu Abb. 12 c,
Inkubation bei 0°C

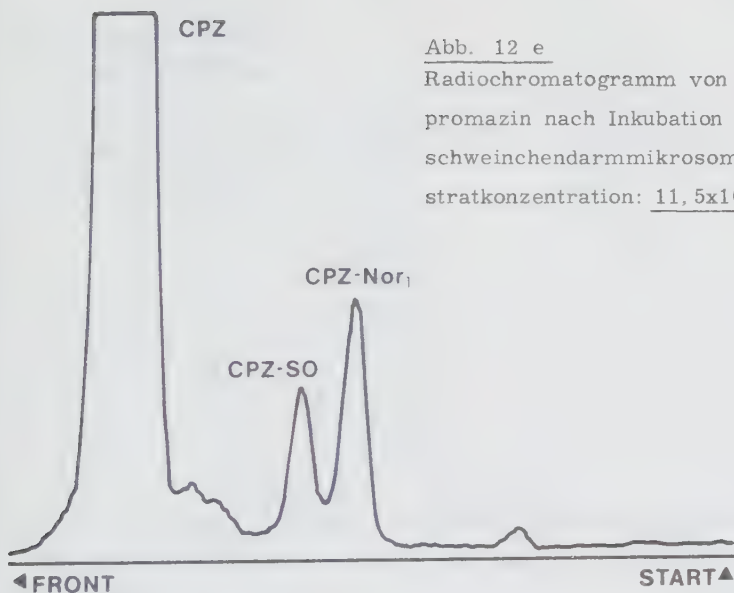


Abb. 12 e

Radiochromatogramm von (³⁵S)-Chlorpromazin nach Inkubation mit Meerschweinchendarmmikrosomen, Substratkonzentration: 11,5x10⁻⁵M/l

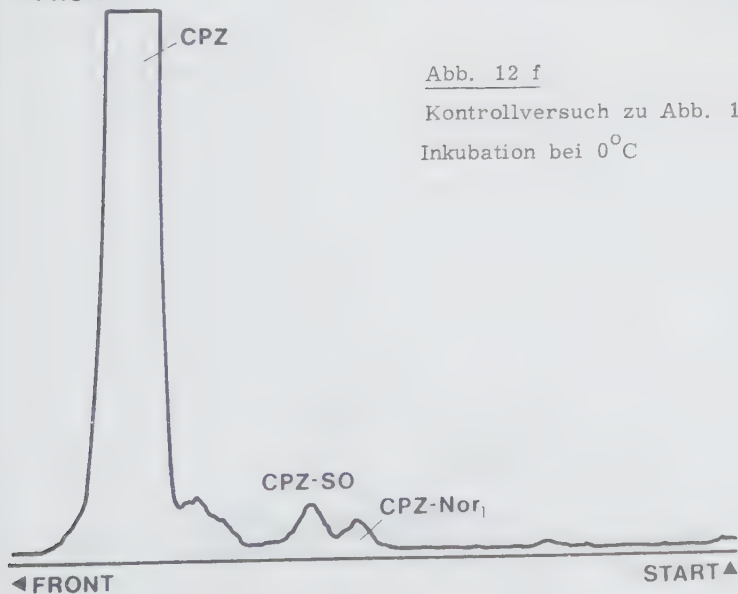


Abb. 12 f

Kontrollversuch zu Abb. 12 e, Inkubation bei 0°C

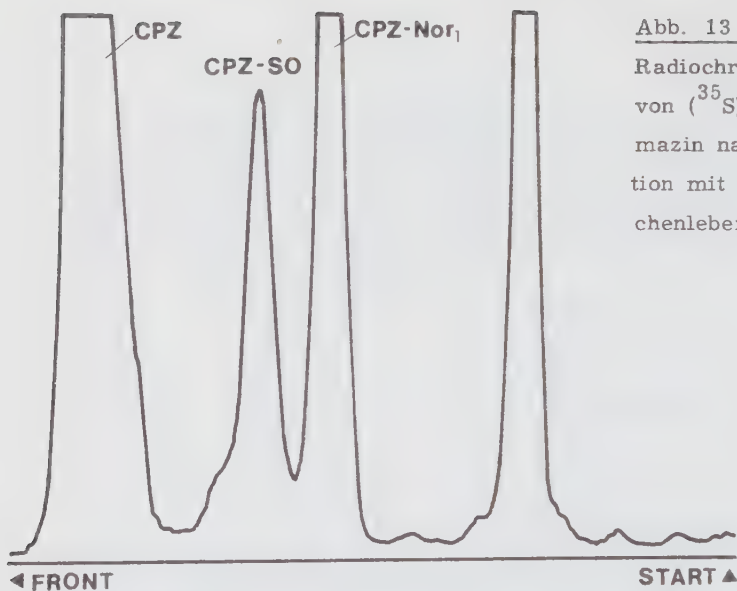


Abb. 13 a

Radiochromatogramm
von (³⁵S)-Chlorpro-
mazin nach Inkuba-
tion mit Meerschwein-
chenlebermikrosomen

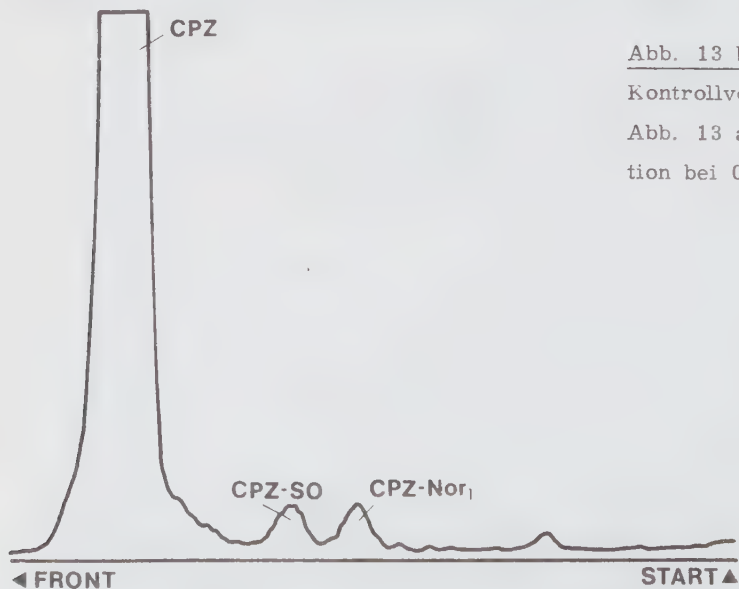


Abb. 13 b

Kontrollversuch zu
Abb. 13 a, Inkuba-
tion bei 0°C

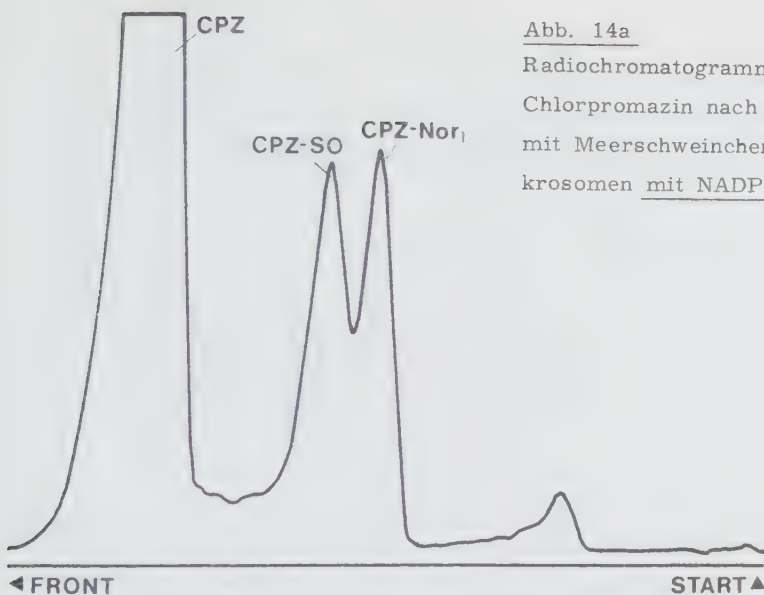


Abb. 14a

Radiochromatogramm von (³⁵S)-
Chlorpromazin nach Inkubation
mit Meerschweinchendarmmi-
krosomen mit NADP⁺

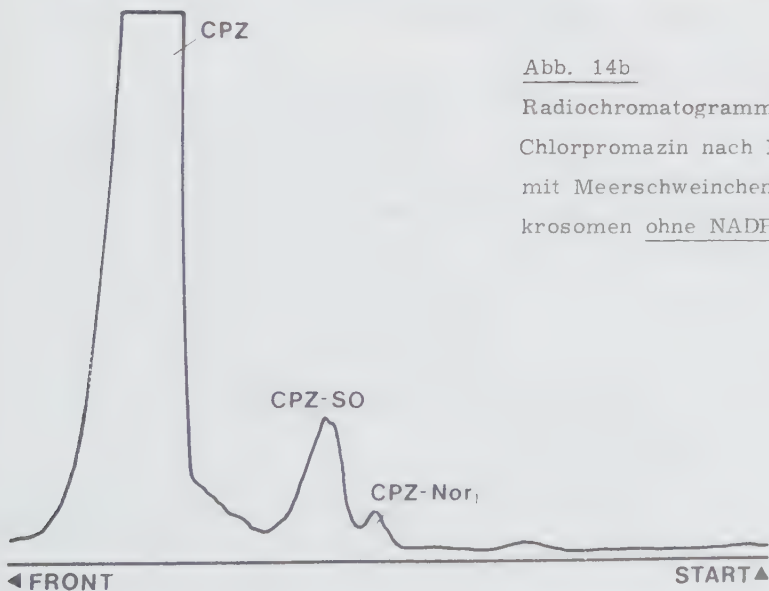


Abb. 14b

Radiochromatogramm von (³⁵S)-
Chlorpromazin nach Inkubation
mit Meerschweinchendarmmi-
krosomen ohne NADP⁺

keine Bildung von CPZ-SO und CPZ-Nor₁ nachzuweisen, es zeigte sich aber auf dem Chromatogramm ein Fleck mit dem RF-Wert des Stickoxids (siehe Abb. 15 a,b; 16 und Tab. A).

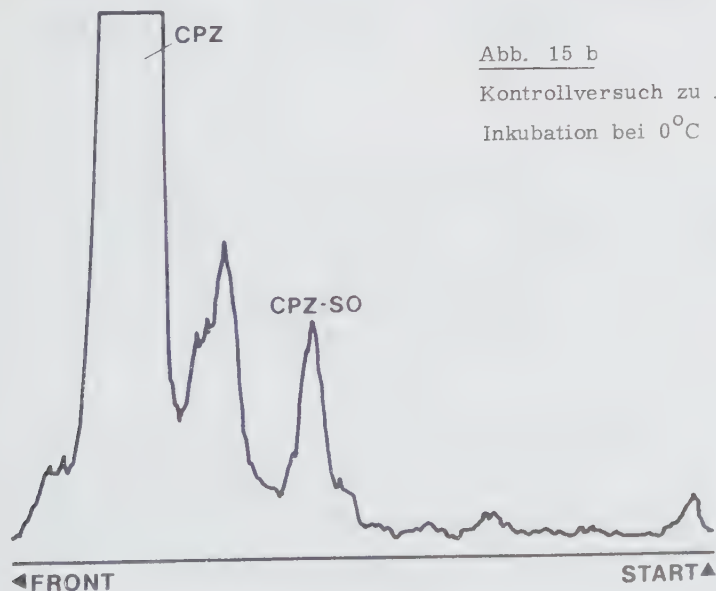
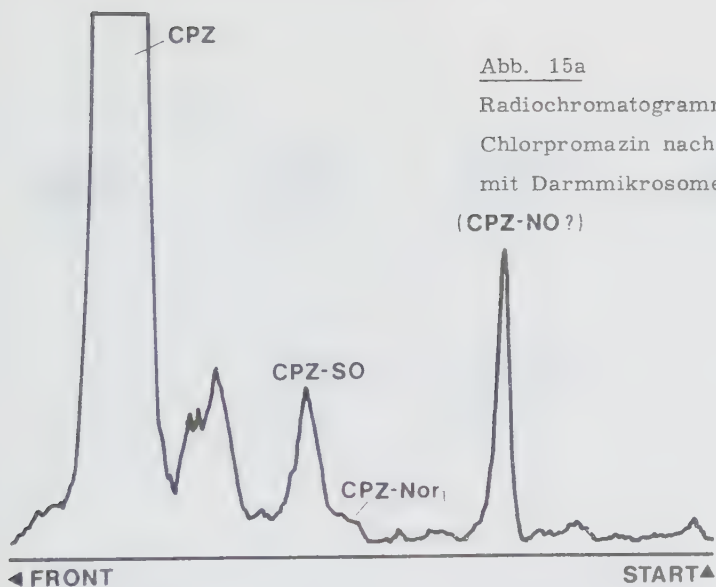
Bei den Kontrollversuchen bildete sich, sowohl bei 0°C, als auch ohne Mikrosomen oder mit denaturiertem mikrosomalem Protein, in begrenztem Umfang Metaboliten. Es entstanden ca. 5 - 1 % Sulfoxid und ca. 2,3 - 0,5 % demethyliertes Chlorpromazin. Die nicht enzymatische Sulfoxidation ist also stärker als die nichtenzymatische Demethylierung des Moleküls.

Die Metaboliten der Kontrollversuche bildeten sich umso stärker, je länger die Bearbeitung dauerte. Nach 48-stündigem Stehen des Ansatzes war, auch bei Aufbewahrung unter Lichtausschluß, auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar mehr Sulfoxid als nach einer Stunde entstanden.

Bei Inkubationen von (³⁵S)-Perazin mit Meerschweinchendarm-mikrosomen bildete sich nur etwa 1 % Sulfoxid enzymatisch. Da die Substanz aber nur mit relativ geringer spezifischer Aktivität zur Verfügung stand, mußte mit größeren Konzentrationen gearbeitet werden (6×10^{-4} M/l).

In diesem Bereich kommt es bereits zur Substrathemmung (BREYER, 1970).

Versuche mit der gleichen Konzentration an (³⁵S)-Chlorpromazin ergaben nur noch $\sim 1/5$ der Sulfoxidmenge, die bei (S) = 1×10^{-4} M gebildet wurde.



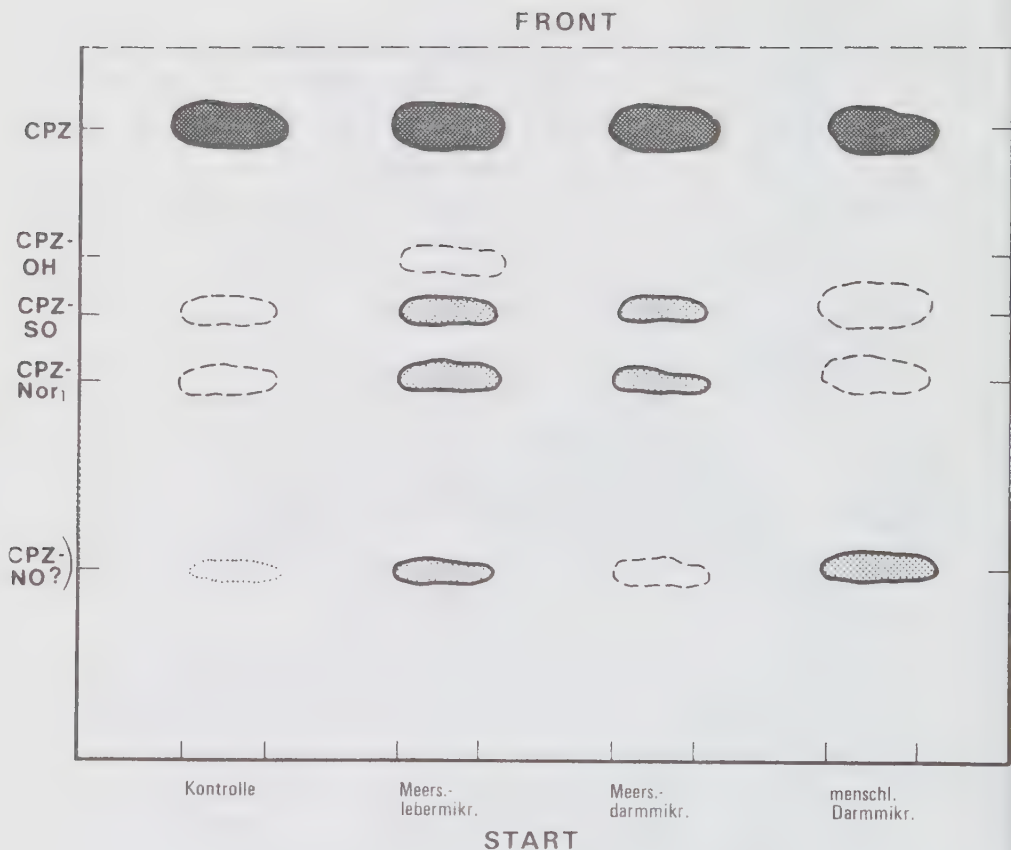


Abb. 16

Dünnschichtchromatogramm von Chlorpromazin nach Inkubation mit Meerschweinchenleber- und Meerschweinchendarmmikrosomen, Darmmikrosomen vom Menschen und nach Inkubation ohne Mikrosomen, bzw. bei 0°C (Kontrolle)
 Fließmittel: Isopropanol / Chloroform / Wasser / Ammoniak (25%-ig)
 (128 / 64 / 8,8 / 7,2; v/v)

Tabelle A

RF-Werte von CPZ, CPZ-SO und CPZ-Nor₁

Fließmittel	CPZ	CPZ-SO	CPZ-Nor ₁
A	0,53	0,39	0,26
B	0,89	0,63	0,54
C	0,44	0,10	0,63
D	0,75	0,39	0,87

A) Methanol / Aceton / Wasser (100 / 100 / 2 ; v/v)

B) Isopropanol / Chloroform / Wasser / Ammoniak (25%)

(128 / 64 / 8,8 / 7,2; v/v)

C) Essigsäureisopropylester / Isopropanol / Eisessig / Wasser

/ Methanol

(58 / 19 / 14 / 9 / 10 ; v/v)

D) Äthanol / Eisessig / Wasser (50 / 20 / 10 ; v/v)

IX Reaktionshemmung

Von den Hemmstoffen der mischfunktionellen Mikrosomenenzyme, Metyrapon, SKF 525 A, Iridocin x HCl und Thionicotinsäureamid, erwies sich nur SKF 525 A als wirksam gegenüber der Sulfoxidation und in geringem Maße gegenüber der Demethylierung des Chlorpromazins durch Meerschweinchendarmmikrosomen.

Iridocin zeigte eine schwache, Thionicotinsäureamid und Metyrapon keine Hemmwirkung. Mit SKF 525 A ergaben sich folgende IC_{50} -Werte:

für die Sulfoxidation: 2×10^{-4} M/l

für die Demethylierung: $4,5 \times 10^{-3}$ M/l.

Die Substratkonzentration betrug $7,5 \times 10^{-5}$ M/l. Die IC_{50} -Werte waren bei verschiedenen Versuchen mit unterschiedlicher Enzymkonzentration übereinstimmend (siehe Abb. 17).

X Bestimmung der Michaeliskonstanten

Durch Inkubation mit Meerschweinchendarmmikrosomen bei verschiedenen Substratkonzentrationen wurde für die Sulfoxidbildung eine Michaeliskonstante von $2 - 3 \times 10^{-5}$ M/l gefunden, für die Demethylierung eine von $4 - 5 \times 10^{-5}$ M/l. Die gleichen Werte ergaben sich auch bei Entwicklung in einem anderen Fließmittel und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Die Auswertung der Ergebnisse nach Lineweaver-Burk, durch Regressionsgerade und durch Anwendung der Methode nach Eisenthal und Cornish-Bowden führte ebenfalls zu übereinstimmenden Resultaten (Abb. 18a, b, c, d, e, f und 19 a, b).

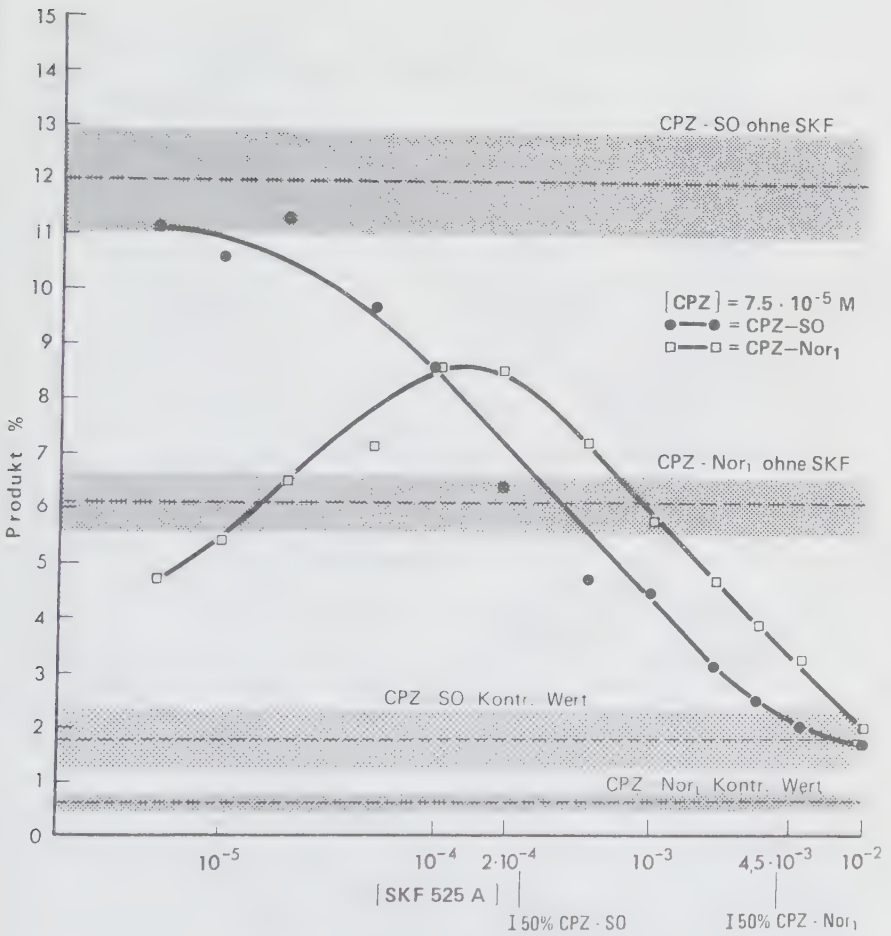


Abb. 17

Reaktionshemmung durch SKF 525 A

bei Inkubation von Chlorpromazin mit Meerschweinchendarmmikrosomen

Abb. 18a

Substratabhängigkeit der Sulfoxidation und N-Demethylierung von Chlorpromazin mit Meerschweinchendarmmikrosomen

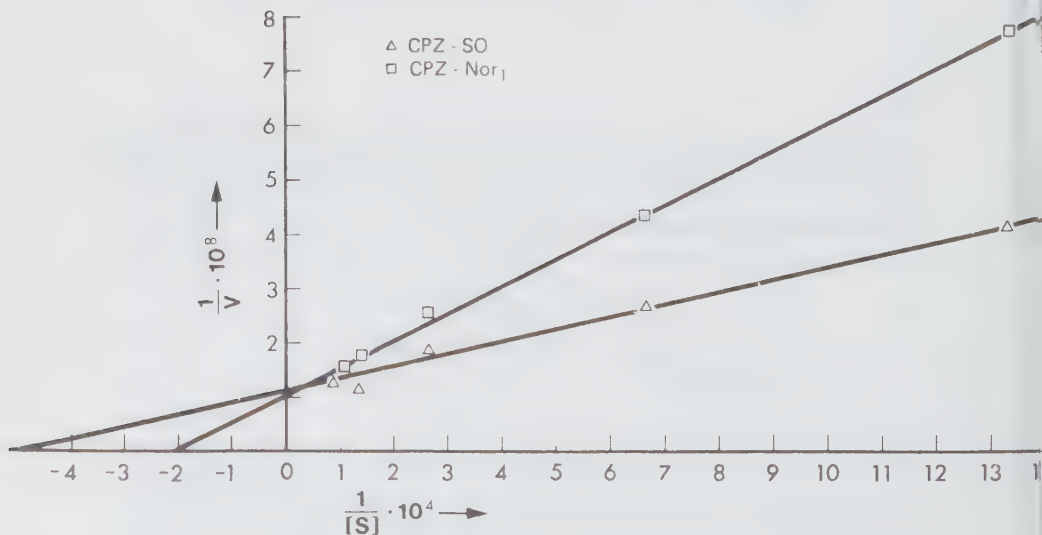
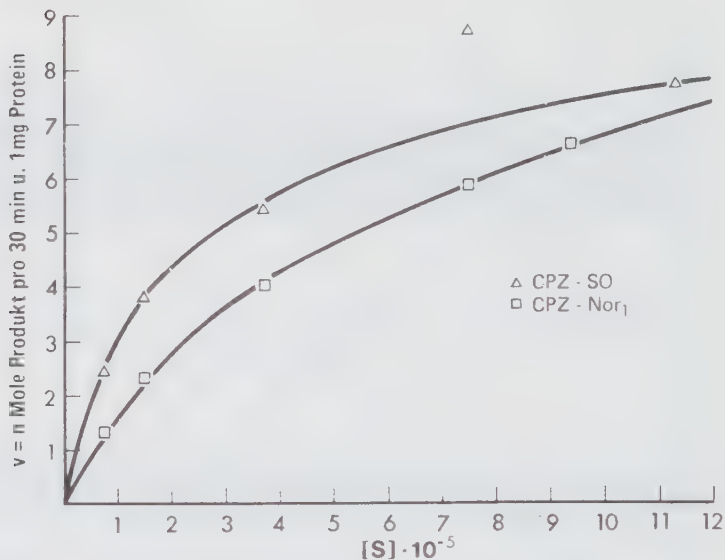


Abb. 18b

Bestimmung der K_M -Werte nach Lineweaver-Burk

Abb. 18 c

Ausgleichsgerade von Abb. 18 b

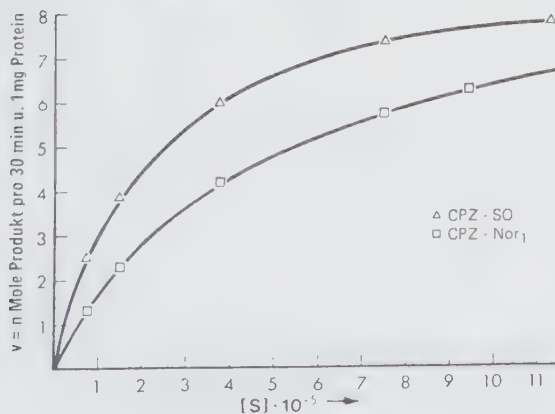
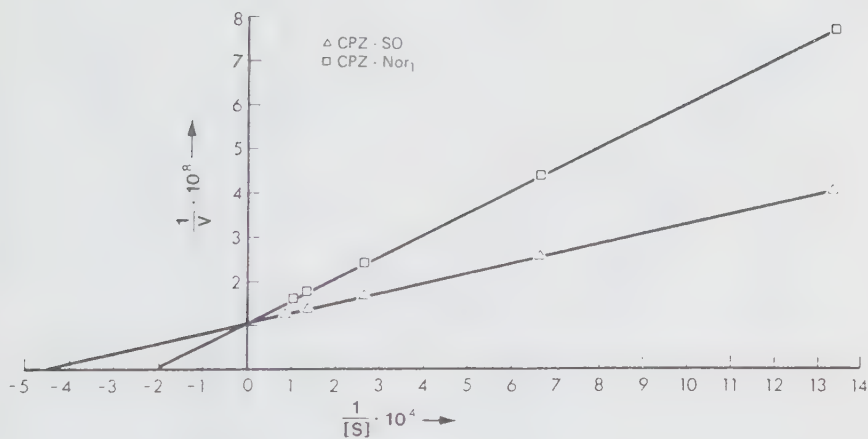


Abb. 18 d

Rekonstruktion der Substratabhängigkeitskurve aus der Ausgleichsgeraden Abb. 18 c

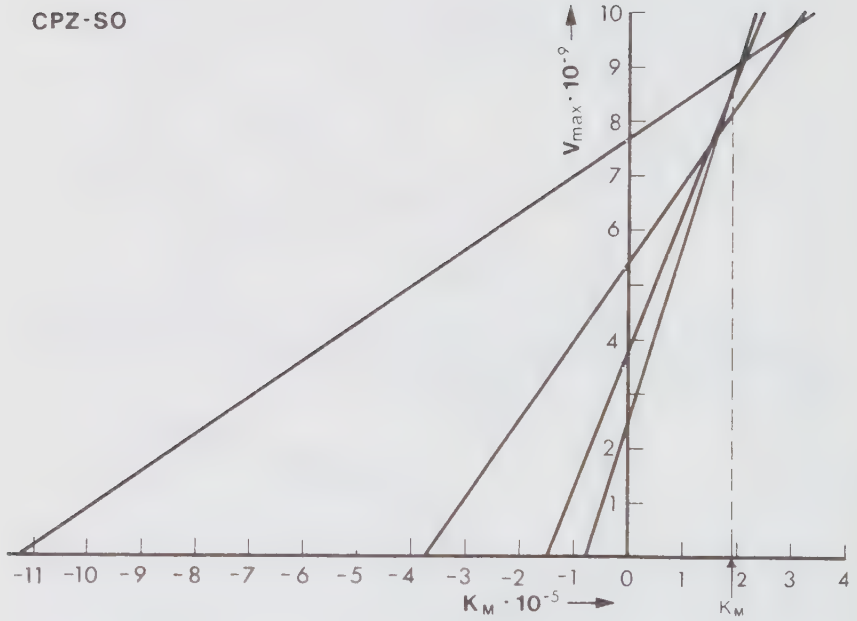


Abb. 18 e

Bestimmung der Michaeliskonstante für die Sulfoxidation nach der Methode von Eisenthal und Cornish-Bowden

CPZ-Nor₁

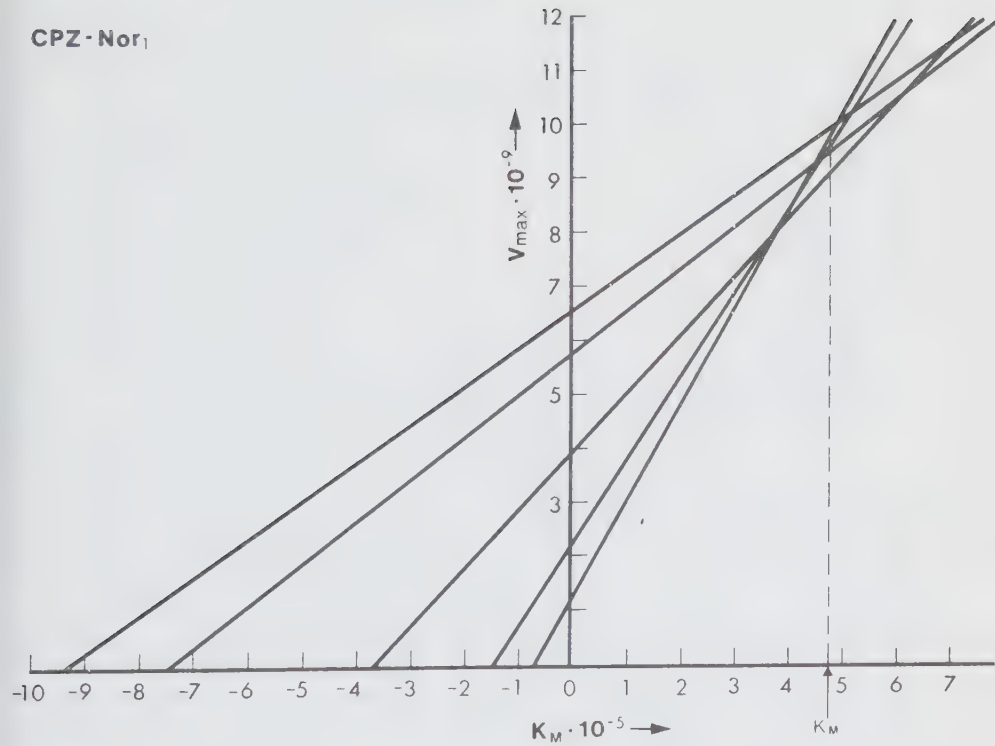


Abb. 18 f

Bestimmung der Michaeliskonstante für die N-Demethylierung
nach der Methode von Eisenthal und Cornish-Bowden

Abb. 19a

Substratabhängigkeit der Sulfoxidation und N-Demethylierung von Chlorpromazin durch Meerschweinchendarmmikrosomen, Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme in Fließmittel B und C

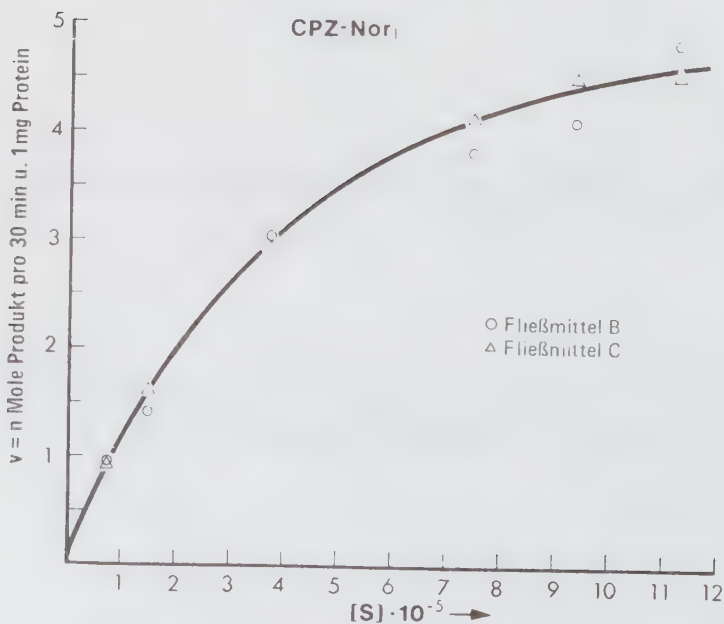
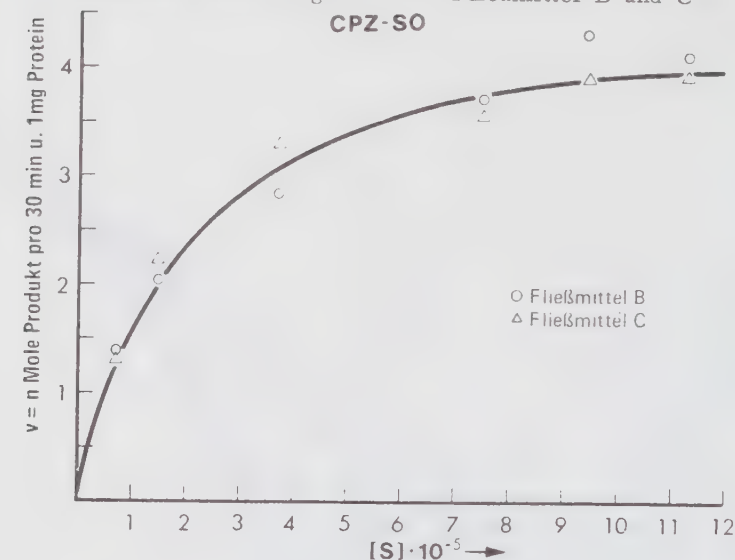
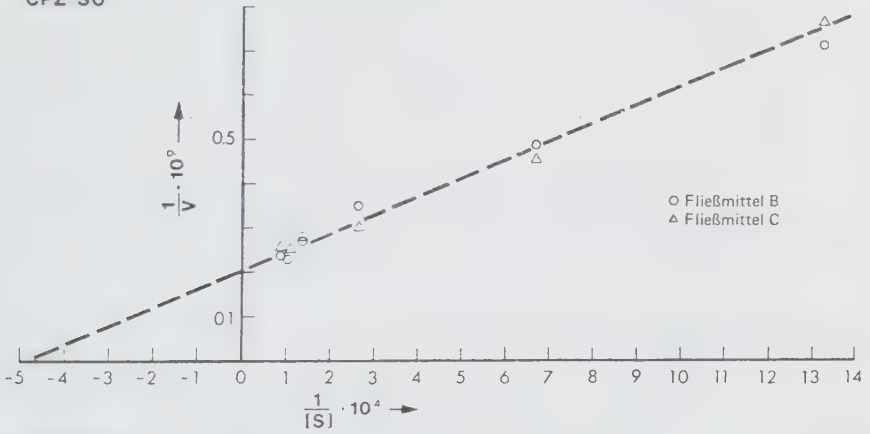


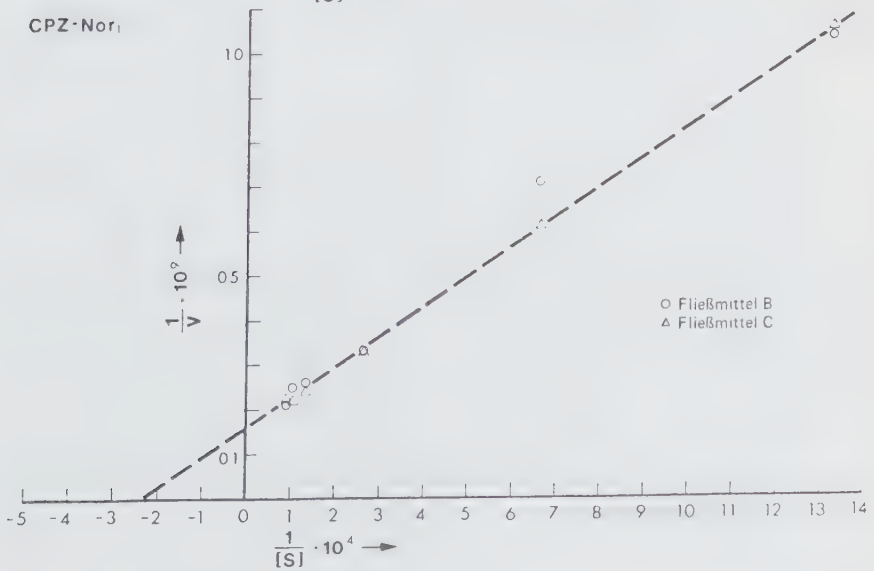
Abb. 19b

Darstellung der Abb. 19a im Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der K_m -Werte

CPZ-SO



CPZ-Nor₁



XI Zeitabhängigkeit

Durch Variation der Inkubationszeit wurde die Dauer der Linearität der Reaktion geprüft. Dabei ergab sich für die Sulfoxidation eine linear verlaufende Umsatzgeschwindigkeit bis zu 30 min, für die Demethylierung bis zu 50 min Inkubationsdauer.

Unter den gewählten Bedingungen betrugen die Anfangsgeschwindigkeiten:

$5,6 \times 10^{-10}$ (Mol $\times$ min $^{-1}$ $\times$ mg $^{-1}$ Protein) für die Sulfoxidation
 $2,4 \times 10^{-10}$ (Mol $\times$ min $^{-1}$ $\times$ mg $^{-1}$ Protein) für die Demethylierung (siehe Abb. 20).

XII Selbstinduktion

Um festzustellen, ob sich durch orale Gabe von Chlorpromazin im Darm eine Enzyminduktion in vitro nachweisen läßt, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Mehrere Meerschweinchen erhielten statt Leitungswasser destilliertes Wasser, in dem 12 mg Chlorpromazin und 4 g Glukose auf 100 ml gelöst waren. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Lösung ohne Chlorpromazin.

Die Versuchstiere nahmen pro Tag durchschnittlich eine Flüssigkeitsmenge zu sich, die ca. 20 mg Chlorpromazin/kg entsprach.

Nach 3 - 4 Tagen wurde die Mehrzahl der behandelten Tiere apathisch, sie tranken weniger und verloren an Gewicht.

Mehrere hatten eine Leberverfettung und Obstipation. Bei den Kontrolltieren zeigten sich keine Veränderungen. Nach 9 Tagen dieser Behandlung wurden die Tiere dekapitiert und die

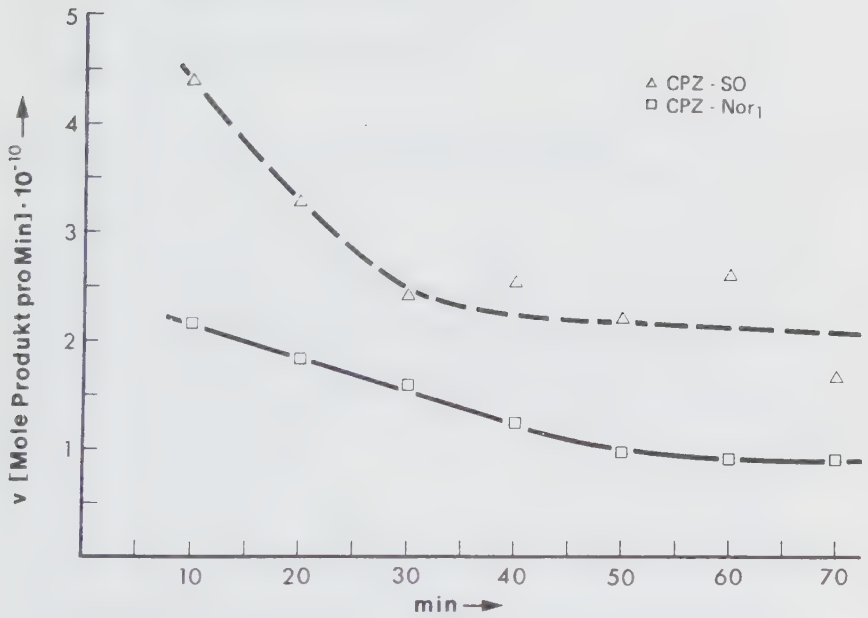


Abb. 20

Zeitabhängigkeit der Sulfoxidation und Demethylierung von Chlorpromazin durch Meerschweinchen darmmikrosomen, Substratkonzentration : $8,45 \times 10^{-5} \text{ M/l}$

Mikrosomenfraktion aus der Dünndarmmukosa gewonnen.
Danach wurden in beiden Gruppen

1. der Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt der Mikrosomen bestimmt sowie
2. die Reaktionsgeschwindigkeit und
3. die kinetischen Konstanten geprüft.

Zu 1.

Die Cytochrom-P₄₅₀-Bestimmung bei Mikrosomen CPZ-behandelter Tiere ergab 0,15 - 0,17 nMole/mg Protein. Damit unterscheidet sich der Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt dieser Darmmikrosomen nicht von dem der Kontrollen.

Zu 2.

Ein Vergleich der unter den gewählten Bedingungen erreichten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten ergab ebenfalls keine erkennbare Differenz zwischen Versuchen mit Mikrosomen von Versuchstieren und denen von Kontrollen (siehe Tab. B). Die Mittelwerte lagen für die Sulfoxidation bei $1,7 \times 10^{-10}$ Mole Produkt pro min und mg Protein und für die Demethylierung bei $1,1 \times 10^{-10}$ Mole Produkt pro min und mg Protein. Diese Ergebnisse liegen unter den V_{max}-Werten, die sich aus Abb. 18 ergeben, da diese Versuche mit höherer Inkubationsdauer durchgeführt wurden, woraus sich eine geringere Durchschnittsgeschwindigkeit ergibt.

Auch Abb. 21a und b geben weder für die Sulfoxidbildung noch für die Demethylierung bei Mikrosomen vorbehandelter und nichtbehandelter Tiere einen Hinweis auf eine Enzyminduktion.

Tabelle B

Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten

1) Sulfoxidation

CPZ-vorbehandelte Meerschweinchen	Kontrolltiere
$2,7 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$2,8 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,6 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,7 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,45 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,5 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$2,3 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$2,4 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,4 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,2 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,0 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$0,9 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$m=1,74 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,75 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

2) Demethylierung

$1,6 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,7 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$0,95 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,1 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,0 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$0,75 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$0,9 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$1,25 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,1 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$0,9 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$0,8 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
$m=1,075 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	$1,1 \times 10^{-10} \text{ M x min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

(die gegenüberstehenden Werte stammen jeweils aus dem gleichen Versuch)

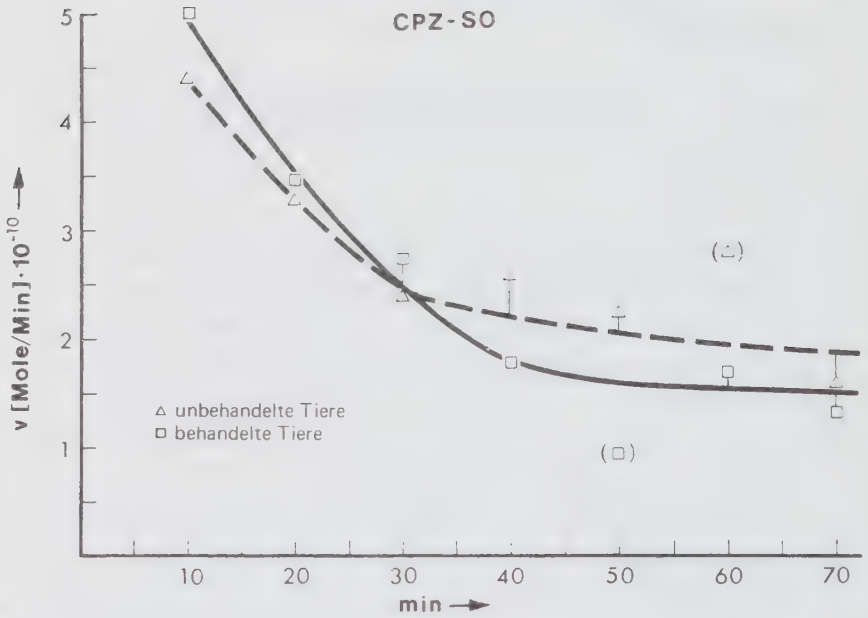


Abb. 21 a

Zeitabhängigkeit der Sulfoxidation von Chlorpromazin durch Meer-
schweinchendarmmikrosomen von chlorpromazinvorbehandelten
und unbehandelten Tieren

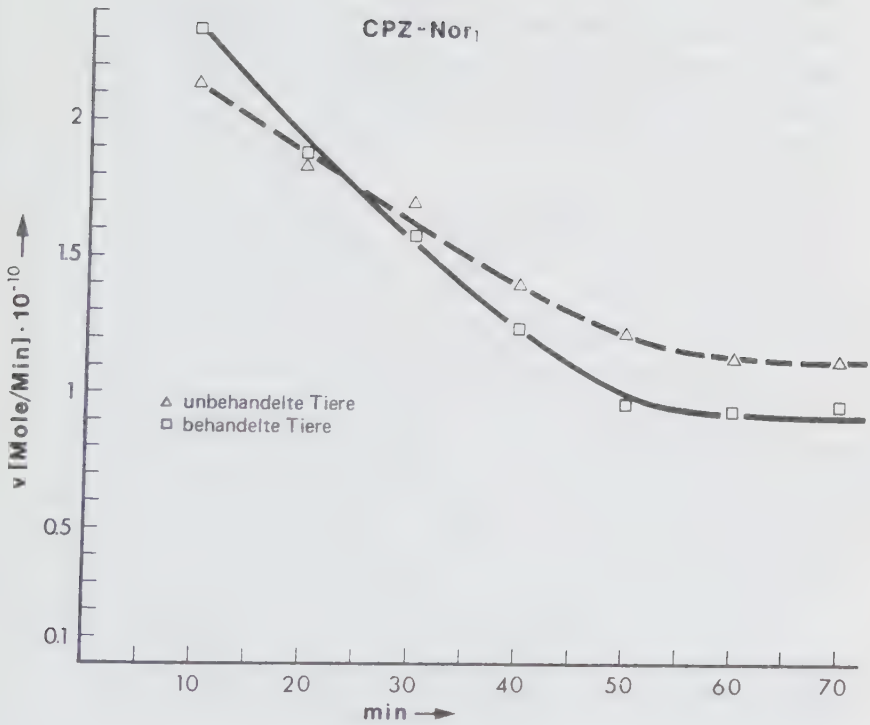


Abb. 21 b

Zeitabhängigkeit der Demethylierung von Chlorpromazin durch Meerschweinchendarmmikrosomen von chlorpromazinvorbehandelten und unbehandelten Tieren

Zu 3.

Die Michaeliskonstanten, die sich aus Versuchen mit Mikrosomen von Chlorpromazin-vorbehandelten Tieren ergaben, lagen für die Sulfoxidation zwischen 2 und 3×10^{-5} M/l und für die Demethylierung bei 5×10^{-5} M/l. Sie unterscheiden sich also nicht von den Werten aus anderen Versuchen mit Mikrosomen unbehandelter Meerschweinchen.

Diskussion

Ein weitgehend ungeklärtes Problem ist die mehrfach bestätigte Feststellung, daß eine Reihe von Patienten mit einer schizophrenen Psychose gegenüber Chlorpromazin therapieresistent sind (SAKALIS et al., 1972; RIVERA-CALIMLIM et al., 1973; SVED et al., 1971; CURRY und MARSHALL, 1967; SAKURAI et al., 1975; ADAMSON et al., 1973).

Bemerkenswerterweise sind auch die Nebenwirkungen des Pharmakons bei diesen sogenannten non-respondern verringert oder treten gar nicht auf. Die Vermutung lag nahe, daß bei ihnen Chlorpromazin nicht resorbiert oder sehr schnell verstoffwechselt wird. SVED, PERALES und PALAIC (1971) konnten jedoch anhand von Urinuntersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Metabolismusrate und Wirkungsgrad feststellen. 1972 fanden SAKALIS et al. große individuelle Unterschiede in der Chlorpromazinkonzentration im Plasma. Trotzdem unterschied sich auch bei diesen Patienten die Metabolitenkonzentration im Urin kaum. Außerdem zeigten viele Patienten auch bei geringer Plasmakonzentration an Chlorpromazin klinische Besserung. Die Autoren nahmen an, die unterschiedliche Wirkungsintensität würde weniger von der Blutkonzentration an unverändertem Chlorpromazin bestimmt als von individuellen Differenzen im Abbauweg des Pharmakons. Responder könnten z. B. mehr aktive Metaboliten bilden, bzw. non-responder mehr inaktive Metaboliten (ALFREDSSON et al., 1977; LAL und SOURKES, 1971; POSNER et al., 1962; MANIAN et al.,

1971; SALZMAN und BRODIE, 1956; DAVIDSON et al., 1957), zumal in der genannten Arbeit von SAKALIS et al. auf einen Patienten hingewiesen wurde, der auf Chlorpromazin nicht ansprach und bei dem besonders hohe Konzentrationen an Chlorpromazinsulfoxid im Plasma gefunden wurden. Inzwischen zeigten jedoch ALFREDSSON et al. (1977), daß die pharmakologische Wirkung des Chlorpromazins hauptsächlich durch die unveränderte Substanz und weniger durch ihre Metaboliten hervorgerufen wird, auch wenn zwischen Wirkung und Plasmakonzentration offenbar keine direkte Beziehung besteht (SAKALIS et al., 1972; CALIMLIM und CASTANEDA, 1973; CLARK und KAUL, 1975). CURRY et al. verglichen in einer Arbeit von 1970 Plasmakonzentrationen an Chlorpromazin und dessen Metaboliten nach verschiedenen Darreichungsformen. Bei gleicher Dosis nahm die Konzentration in der Reihenfolge: i. v. -, i. m. -, perorale Anwendung erwartungsgemäß ab. Doch zeigten sich zwischen den verschiedenen Patienten wiederum große Differenzen. Ähnliche Befunde sind auch bei Untersuchungen mit Imipramin und Clomipramin von NAGY (1976) und mit Fluphenazin von CURRY (1977) beschrieben. Die Pharmakonzentrationen waren nach peroraler Gabe in Blut und Gehirn deutlich geringer als nach parenteraler, während die Konzentration der Metaboliten nach peroraler Gabe höher lag. ADAMSON et al. (1973) gaben Patienten, die nach oraler Gabe von Chlorpromazin keine Besserung zeigten, mit gutem Therapieerfolg die Substanz Fluphenazindecanoate parenteral. Zu entsprechenden Ergebnissen waren früher schon LEWIS et al. (1971) gekommen. Doch führten sie den Wirkungsverlust nach oraler Gabe noch auf eine

schlechtere Absorption zurück.

Bereits 1971 vermutete CURRY, daß Chlorpromazin in der Darmwand während des Transfers vom Darmlumen in den allgemeinen Kreislauf metabolisiert wird. Die Übersichtsarbeit von HARTIALA (1973) zitiert übrigens eine Veröffentlichung von 1943, die die Oxidation von Phenothiazinen im Schafdarm beschreibt.

Da in den Experimenten von CURRY i.p.-Dosis und i.v.-Dosis wirkungsgleich waren, konnte der Verlust an unverändertem Chlorpromazin nicht während der ersten Leberpassage entstehen. Oral gegebenes Chlorpromazin müßte also abgebaut werden, bevor es den Pfortaderkreislauf erreicht. Die dabei entstehenden Metaboliten, wohl hauptsächlich das Sulfoxid, werden gut absorbiert und mit den in der Leber gebildeten Metaboliten später ausgeschieden. Daß das Sulfoxid rasch und vollständig absorbiert wird, neuroleptisch aber weniger wirksam als Chlorpromazin ist, zeigten DAVIDSON et al. schon 1957 (siehe auch POSNER et al., 1962; SALZMAN und BRODIE, 1956). Auch ADAMSON et al. interpretieren ihre Befunde als Inaktivierung des Phenothiazins in der Darmwand. Auf diese Weise wäre auch die hohe Plasmakonzentration des biologisch unwirksamen Chlorpromazinsulfoxids bei therapieresistenten Patienten zu erklären (SAKALIS et al., 1973).

Diese Annahme wird durch Versuche von RIVERA-CALIMLIM (1976) gestützt, nach denen Chlorpromazin um so stärker verstoffwechselt wird, je länger es im Gastrointestinaltrakt verbleibt. Sie steht auch nicht im Widerspruch zu den Befunden

von SVED et al. (1971), die, wie erwähnt, bei chlorpromazin-behandelten Patienten keinen Zusammenhang zwischen Metabolitengehalt im Urin und Wirkungsgrad fanden. Doch bleibt die Frage offen, ob responder und non-responder Chlorpromazin unterschiedlich zu aktiven Metaboliten, wie z.B. 7-OH-CPZ, bzw. inaktiven Metaboliten, wie z.B. CPZ-SO, verstoffwechseln und wo im Organismus dies geschieht.

1971 wurden Untersuchungen von zwei Arbeitsgruppen (CURRY et al. und MINDER et al.) veröffentlicht, die geprüft hatten, ob und in welchem Umfang Chlorpromazin im Darm verändert wird. CURRY et al. fanden bei Ratten nach oraler Gabe eine 3 - 10-mal geringere Plasmakonzentration an Chlorpromazin als nach der gleichen parenteral gegebenen Dosis, wobei die Ausscheidungsraten der Metaboliten bei beiden Anwendungsformen keine Unterschiede aufwiesen. In vitro Untersuchungen mit der Methode von FISHER und PARSONS (1949) ergaben: Chlorpromazin wird rasch vom Darmgewebe absorbiert, ein Teil wird metabolisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse diskutierten die Autoren drei Abbaumöglichkeiten:

1. im Darmlumen, mit oder ohne Hilfe der Darmflora,
2. in der Darmwand und
3. während der ersten Passage durch die Leber.

Die Argumente gegen die 3. Möglichkeit wurden bereits dargelegt. Gegen den 1. Punkt führten die Autoren die Tatsache an, daß nur sehr kleine Produktmengen in der Lösung des Darmlumens gefunden worden waren. Die Möglichkeit eines bakte-

riellen Abbaus wurde weitgehend ausgeschaltet, da die Versuchstiere für die in vitro Versuche über Nacht hungerten, bzw. die Därme gut gespült und so weitgehend vom Darminhalt befreit waren.

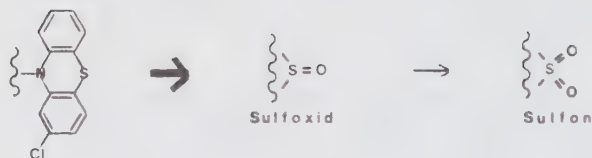
MINDER et al. (1971) konnten eine Chlorpromazinsulfoxidbildung durch Rattendarm (9 000 g Überstand) in vitro nicht nachweisen. Auch WALSH und LEVINE (1973) kamen in ihren Experimenten zu dem gleichen negativen Ergebnis. SUNDARESAN und RIVERA-CALIMLIM (1975 und 1976) fanden zwar mit Hilfe der "everted sac"-Methode Metaboliten in den Darmsegmenten nach oraler Chlorpromazingabe, konnten aber einen Metabolismus durch Rattendarm ebenfalls nicht feststellen. Die Autoren meinten, die Metaboliten würden im enterohepatischen Kreislauf entstehen.

Derartig widersprüchliche Befunde lassen sich möglicherweise durch unterschiedliche in vitro Methoden erklären. Denn es ist unstrittig, daß auch der Rattendarm zu entgiftenden Stoffwechselleistungen fähig ist (PANTUCK et al., 1976; RANCE und SHILLINGFORD, 1976).

Die Hauptmetaboliten des Chlorpromazins entstehen durch oxidative Prozesse: Sulfoxidation, Demethylierung und Hydroxylierung der Ringstruktur.

Bei der Oxidation am Schwefelatom entsteht durch enzymatische Katalyse das Sulfoxid, das zum Sulfon oxidiert werden

kann:



Die Demethylierung der zwei Methylgruppen am tertiären Stickstoffatom der tricyclischen Psychopharmaka erfolgt mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so daß ein größerer Anteil an Nor₁-Produkt gefunden wird als an Nor₂-Produkt (BICKEL et al., 1966):



Darüberhinaus kann am tertiären Stickstoff Sauerstoff angelagert werden, wobei ein Stickoxid entsteht:



Ein weiterer Hauptabbauweg ist die Hydroxylierung am C₇:



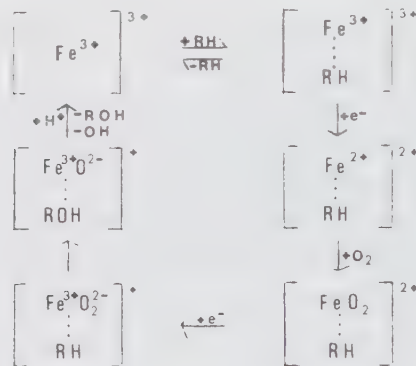
Die genannten Reaktionen werden, mit Ausnahme der Stickstoffoxidation (GORROD et al., 1974), durch Enzyme des mikrosomalen Systems, den sogenannten mischfunktionellen Oxydasen oder Monooxygenasen, katalysiert (KAMM et al., 1958; BAKER und CHAYKIN, 1962; BRODIE et al., 1958; ZIEGLER et al., 1970; MACHINIST et al., 1966; GILLETTE und KAMM, 1960; FORREST et al., 1970; ROBINSON und BEAVEN, 1964; PEREL et al., 1974). Außerdem sind für einzelne Abbauwege wahrscheinlich noch besondere Enzymeinheiten verantwortlich.

1957 entdeckte MASON, daß bestimmte Enzyme zur direkten Oxygenierung von organischen Substanzen elementaren Sauerstoff verwenden. Werden beide Sauerstoffatome des O₂-Moleküls in das Substrat eingeführt, heißen die entsprechenden Enzyme Dioxygenasen (HAYAISHI, 1962).

Zu den häufig vorkommenden Monooxygenasen zählen die eisenhaltigen Systeme mit Cytochrom-P₄₅₀ als terminaler Oxydase. Sie benötigen als Elektronendonator NADPH₂. Cytochrom-P₄₅₀ wurde 1958 von KLINGENBERG und GARFINKEL in der Mikrosomenfraktion von Rattenleber entdeckt. Es bildet im reduzierten Zustand eine Kohlenmonoxidverbindung mit einem Ab-

sorptionsmaximum bei 450 nm.

Bei vielen der bisher untersuchten Monooxygenasen, wie z.B. der Steroid-11- β - und 21-Hydroxylase, erwies sich Cytochrom P_{450} als die sauerstoffaktivierende Komponente (ESTABROOK et al., 1963). Der Reaktionsablauf läßt sich wie folgt darstellen (ULLRICH, 1972):



Das Cytochrom- P_{450} hat eine sehr geringe Substratspezifität und kann deshalb fast jeden Fremdstoff, mit dem es in Kontakt kommt, oxidieren. Außerdem zeigt es aufgrund seiner hohen Umsatzrate rasche Adaption an Substratüberangebote, so daß es besonders schnell auf Veränderungen in der Biophase reagieren kann. Sehr viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Rolle des Cytochrom- P_{450} , seiner Struktur, seinem Reaktionsmechanismus, seinen besonderen Eigenschaften und verschiedenen Formen. Eine Übersichtsarbeit zu diesem Thema gibt es von GILLETTE et al., 1972.

Cytochrom- P_{450} -abhängige Monooxygenaseaktivität wurde hauptsächlich in der Leber aber auch im Darm und anderen Geweben

nachgewiesen (CHHABRA et al., 1974; CHHABRA und FOUTS, 1975; FEUER et al., 1970; HOENSCH et al., 1976; LAKE et al., 1973).

1973 wiesen BICKEL und STEELE nach, daß Chlorpromazin reversibel an Mikrosomen und Mitochondrien gebunden wird, und zwar wesentlich stärker als an Zellkerne und lösliche Zellbestandteile. Ein Vergleich der Bindungskapazitäten von Mikrosomen aus Leber, Lunge, Niere, Hirn und Skelettmuskel führte zu fast identischen Ergebnissen.

Um das beschriebene Monooxygenasesystem bei meinen Versuchen einsetzen zu können, mußte folglich die Mikrosomenfraktion aus dem entsprechenden Gewebe gewonnen werden.

Eine Untersuchung von CHHABRA und FOUTS (1975) zeigt, daß die Aktivität metabolisierender Enzyme in den obersten Dünndarmabschnitten am höchsten ist und dann stetig abnimmt bis zum Dickdarm. HOENSCH et al. (1975) untersuchten die einzelnen Zellschichten der Darmmukosa und kamen zu dem Ergebnis, daß die dem Darmlumen zugewandten obersten Schichten die höchste enzymatische Aktivität zeigen, d.h. 6 - 10-mal mehr an Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt und entsprechender Metabolisierungsaktivität als die tiefer liegenden Zellen.

Die Monooxygenaseaktivität kann durch proteolytische Enzyme, die sich in Dünndarmhomogenaten befinden, zerstört werden (ORRENIUS et al., 1969).

LEHRMANN et al. (1972) fanden in Darmmukosahomogenaten von Mäusen eine zeitabhängige Abnahme der Enzymaktivität, die sich

durch Zugabe von Trypsininhibitor verhindern ließ. Allerdings führte die Inhibitorzugabe zu teilweiser Aggregation des membranösen Materials, so daß die anschließende Zentrifugation bereits bei 20 000 g zu vollständiger Sedimentation des meisten Proteins führte. Folglich ergaben sich bei der Herstellung von Mikrosomen große Aktivitätsverluste.

In meinen Versuchen mit Ratten- und menschlichem Darmgewebe war auch mit Zusatz von Trypsininhibitor keine Fermentaktivität nachweisbar. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die negativen Ergebnisse durch Proteolyse bedingt sind.

CHHABRA et al. (1974) verglichen in einer systematischen Studie den Metabolismus von Pharmaka bei verschiedenen Tierespezies, sowohl durch Leber- als auch durch Darmmikrosomen. Dabei ergab sich eine Abnahme des Cytochrom-P₄₅₀-Gehaltes und der enzymatischen Aktivität des Darms in der Reihenfolge: Kaninchen > Meerschweinchen > Ratte, Maus, Hamster. Rattendünndarmmikrosomen zeigten praktisch keinen Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt. Doch war im Differenzspektrum ein Peak bei 420 - 423 nm vorhanden. Weitere Untersuchungen ließen die Autoren zu dem Schluß kommen: Rattendarmmikrosomen enthalten eine Komponente, die das Cytochrom-P₄₅₀ während der Aufarbeitung der Mikrosomen zum Cytochrom-P₄₂₀ abbaut.

Meine Ergebnisse zum Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt bei Ratten- und Meerschweinchendarm und -leber entsprechen dieser Annahme.

Durch Aussalzen der Mikrosomenfraktion mit CaCl₂ und MgCl₂ in Saccharoselösung ist die Ausbeute an Cytochrom-P₄₅₀ offen-

bar besser (CHHABRA et al.) Doch machten die Autoren keine Angaben über die enzymatische Aktivität dieser Mikrosomenfraktion.

1976 wurde eine Arbeit von ECOBICHON veröffentlicht, die sich mit 3 verschiedenen Herstellungstechniken für Lebermikrosomen beschäftigt (Aussalzen, Gelfiltration und Differentialzentrifugation). In den Versuchen wurde allerdings nicht der Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt sondern die Aktivität einer O-De-methylase, einer Hydroxylase und einer Carboxylase gemessen. Die höchsten Aktivitäten hatten Mikrosomen, die durch Aussalzen, die geringsten Aktivitäten, die nach dem konventionellen Verfahren hergestellt worden waren. In den Rattendarmmikrosomen konnte ich aber auch nach der Methode von KANATH et al. (1971), die auch CHHABRA et al. anwendeten, kein

Cytochrom-P₄₅₀ nachweisen, während Lebermikrosomen, nach dem gleichen Verfahren hergestellt, aktiv waren. BREYER und WINNE (1977) fanden vor kurzem mit Hilfe einer Darmschlinge einen Umsatz von Perazin im Rattendarm zu Per-3-OH, Per-3-OH-glucuronid, Per-SO, Per-Nor₁ und Per-NO. Dieses Ergebnis muß nicht im Widerspruch zu meinen negativen Befunden mit Rattendarmmikrosomen und Perazin und Chlorpromazin stehen, da der Metabolismus der Phenothiazine Cytochrom-P₄₅₀ - abhängig ist.

Aufgrund der Untersuchungen von HOENSCH et al. und CORREIA und SCHMID (1975) befindet sich in geringer Konzentration auch im Rattendarm Cytochrom-P₄₅₀, das aber bei der Aufarbeitung der Mikrosomen zu P₄₂₀ verändert wird. Mit Hilfe von Kohlenmonoxidbegasung während des Herstellungsvorganges gelang es auch mir, Cytochrom-P₄₅₀ komplex zu binden und stabil zu

halten.

Der mit diesem Verfahren gefundene Gehalt von $0,09 \pm 0,02$ nM/mg Protein entspricht den Angaben von HOENSCH et al. (1976). Allerdings kann das komplex gebundene Cytochrom nicht mehr für Inkubationen eingesetzt werden. Eine Rückgewinnung der aktiven Form ist zwar prinzipiell möglich (ZACHARIAH und JUCHAU, 1976), würde aber aufgrund der ohnehin geringen Cytochrom-P₄₅₀-Konzentration und der Empfindlichkeit in der Mikrosomensuspension wahrscheinlich nur zu unbefriedigenden Ergebnissen führen. Auch durch ständige Stickstoffbegasung während der Mikrosomenherstellung konnte ich Cytochrom-P₄₅₀ teilweise vor einem Zerfall schützen. Diese Methode liefert sogar ungebundenes Cytochrom-P₄₅₀, doch nur in so geringer Konzentration, daß auch diese Mikrosomen praktisch inaktiv sein mußten.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt und Chlorpromazinmetabolismus besteht. Mit Mikrosomen, die kein oder nur sehr wenig Cytochrom-P₄₅₀ enthalten aus Ratten- und menschlichem Darm, fand auch keine Sulfoxidation oder Demethylierung statt. Lebermikrosomen, mit höherer Cytochrom-P₄₅₀-Konzentration, zeigten mehr enzymatische Aktivität als Darmmikrosomen. Ohne NADPH-Zugabe zum Inkubationsansatz, von dessen Gegenwart die Funktion des Cytochrom-P₄₅₀ abhängig ist, ergab sich eine verminderte Produktbildung.

Zum qualitativen Nachweis der entstandenen Metaboliten dienten neben den R_F-Werten in verschiedenen Fließmitteln, Re-

chromatographie und UV-Spektren von abgeschabten und eluierten Banden des Dünnschichtchromatogramms. Während dieser Prozedur können Schwierigkeiten bei der Identifizierung des monodemethylierten Produktes auftreten. Chlorpromazin und offensichtlich auch das Monodesmethylchlorpromazin werden sehr leicht sulfoxidiert, so daß sich während des Eluierens der Nor₁-Banden das CPZ-SO-Nor₁ bildet. Diese Reaktion wird durch längeres Schütteln in organischen Lösungsmitteln noch begünstigt. Beim Rechromatographieren ergibt sich folglich ein deutlicher Fleck in Höhe des CPZ-SO-Nor₁. Eine spektrophotometrische Differenzierung ist nicht möglich, da die UV-Spektren von CPZ-SO und CPZ-SO-Nor₁ sich nicht unterscheiden.

Erst durch sehr rasches Arbeiten, wenig Schütteln und Verzicht auf quantitatives Herauslösen der Substanz aus der Kieselgeschicht gelingt die sichere Identifizierung des demethylierten Chlorpromazins. Zu den beschriebenen Sulfoxidationen kommt es auch während der Aufarbeitung der Inkubationsansätze. Um die enzymatisch gebildete Menge Sulfoxid zu bestimmen, müssen deshalb, wie erwähnt, die entsprechenden Ergebnisse der Kontrollwerte abgezogen werden. Auch das gebildete CPZ-Nor₁ wird während der Aufarbeitung möglicherweise zum Teil sulfoxidiert. Dieser Fehler läßt sich mit den Kontrollwerten jedoch nicht ausgleichen. Da aber CPZ-SO und CPZ-Nor₁ stets die Hauptmetaboliten waren und in Höhe des CPZ-SO-Nor₁ nur eine sehr schwache Fluoreszenzlöschung auf dem Chromatogramm sichtbar war, kann die nicht-enzymatische Sulfoxidation des CPZ-Nor₁ die Ergebnisse nur unwesentlich beeinflussen.

Ein zu berücksichtigender methodischer Fehler ist der Befund, daß die Substanzen sich aus dem Kieselgel nicht quantitativ herauslösen lassen. Werden die Standardbedingungen jedoch eingehalten, beträgt der Verlust reproduzierbar ca. 50 % und kann somit rechnerisch korrigiert werden.

Haltbarkeit der Mikrosomen

Eine wichtige Voraussetzung für die praktische Durchführung der Versuche war die Erhaltung der enzymatischen Aktivität. Die Prüfung der Haltbarkeit ergab keinen meßbaren Verlust an Cytochrom-P₄₅₀ während zweimonatiger Aufbewahrung bei -25°C. Der Einfrierungsvorgang selbst wirkte sich nicht vermindern auf die enzymatische Aktivität aus.

Arbeiten zur Haltbarkeit von Mikrosomensuspensionen aus extrahepatischen Geweben gibt es meines Wissens nach nur von zwei Autorengruppen (TREDGER und CHHABRA, 1976; FEUER et al., 1970), während Lebermikrosomen schon mehrmals auf ihre Haltbarkeit unter verschiedenen Bedingungen geprüft wurden (z.B. REINKE und STOHS, 1976; LEADBEATER und DAVIES, 1964; WADE et al., 1971; CRYER und BARTLEY, 1974; HEWICK und FOUTS, 1969; BURKE und BRIDGES, 1972; BULGER und STOHS, 1975; LEVIN et al., 1968; BORTON et al., 1974). Diese Arbeiten zeigen ebenfalls, daß die enzymatische Aktivität und der Gehalt an Cytochrom-P₄₅₀ durch Aufbewahrung des Gewebes oder der entsprechenden Zellfraktion bei niedrigen Temperaturen im allgemeinen erhalten bleiben, wobei jedoch beim Ver-

gleich mehrerer Enzyme unterschiedliche Resultate erzielt werden.

Bei in vitro-Untersuchungen zum Chlorpromazinabbau durch Lebermikrosomen wurden zuerst CPZ-SO und CPZ-Nor₁ gefunden (GILLETTE und KAMM, 1960; ROSS et al., 1962). Weitere Metaboliten durch Versuche mit Rattenlebermikrosomen konnten COCCIA und WESTERFELD (1967) identifizieren. Als Hauptmetaboliten wurden hier CPZ-Nor₁ (14 %), CPZ-SO (10,9 %) und CPZ-NO (7,7 %) gefunden (bei $S = 4 \times 10^{-5}$ M/l). Diese Werte liegen in der Größenordnung meiner Ergebnisse mit Meerschweinchendarmmikrosomen. Allerdings überwiegt, bei einer Substratkonzentration von 4×10^{-5} M/l, die Demethylierung gegenüber der Sulfoxidation, während sich bei meinen Inkubationen mit Darmmikrosomen bei dieser Konzentration mehr CPZ-SO als CPZ-Nor₁ bildete. COCCIA und WESTERFELD zeigten weiterhin, daß mit steigender Inkubationsdauer die Metabolitenbildung quantitativ und qualitativ zunimmt. Nach 45-minütiger Fermenteinwirkung waren im Vergleich zur Inkubationszeit von 15 min neben CPZ-Nor₁, CPZ-SO, 7-OH-CPZ und CPZ-NO zusätzlich CPZ-SO-Nor₁, 3-OH-CPZ, CPZ-SO-NO und CPZ-Nor₂ entstanden, nach 60 min noch 7-OH-CPZ-Nor₁ und 7-OH-CPZ-SO und nach 90 min CPZ-SO-Nor₂ und 7-OH-CPZ-NO.

Derartige Veränderungen aufgrund der verlängerten Inkubationsdauer habe ich bei meinen Versuchen mit Darmmikrosomen nicht feststellen können. Die Ergebnisse aus 30- und 60-minütigen Inkubationen waren qualitativ nahezu identisch. Auch fand

nach 30 min kein wesentlicher Geschwindigkeitszuwachs der Metabolitenbildung mehr statt.

Bei kleinerer Substratkonzentration überwog allerdings die Sulfoxidation gegenüber der Demethylierung. Mit steigen- der Konzentration glich sich diese Differenz aus, bei höherer Substratkonzentration wurde mehr demethyliert. Diese Beobach- tungen entsprechen den gefundenen Michaeliskonstanten.

Der K_m -Wert der Sulfoxidation ist mit $2 - 3 \times 10^{-5}$ M/l etwas kleiner als der K_m der Demethylierung mit $4 - 5 \times 10^{-5}$ M/l. Bei Inkubationen mit menschlichen Darmmikrosomen entstand wahrscheinlich das Stickoxid, dessen Bildung Cytochrom-P₄₅₀- unabhängig sein soll (GORROD et al., 1974).

Kontrolluntersuchungen

Für den Nachweis von enzymatisch katalysierten Reaktionen mußten bei der vorliegenden Arbeit Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden, denn auch nicht-enzymatisch bilden sich, wie erwähnt, CPZ-SO und CPZ-Nor₁, wenn auch in geringerem Umfang als bei Zugabe von enzymatisch aktivem Material. Die Ergebnisse von Inkubationen ohne Mikrosomen bei 37°C und mit Mikrosomen bei 0°C waren gleich. Eine enzymatische Reaktion fand folglich bei 0°C praktisch nicht statt. Die Reinheitsprüfung des eingesetzten Substrats ergab, daß die Metaboliten der Kon- trollversuche erst während der Bearbeitung entstanden sein konnten. In den meisten Arbeiten werden entsprechende Be- funde nicht erwähnt. COCCIA und WESTERFELD (1967) be- schrieben Kontrollversuche mit gekochtem Rattenleberhomoge- nat. Hierbei ergaben sich 2 - 3 % CPZ-SO gegenüber 7 % CPZ-SO

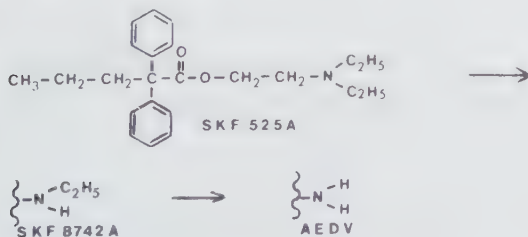
mit unbehandeltem Homogenat. Mit denaturierten Mikrosomen fanden sie nur 0,5 % CPZ-SO. Andere Metaboliten wurden von COCCIA und WESTERFELD bei den Kontrollen nicht gefunden. MINDER et al. (1970) stellten ebenfalls eine Sulfoxidbildung fest, die offensichtlich nicht enzymatisch, sondern nur Fe^{2+} -katalysiert war, wodurch sich hohe Sulfoxidwerte bei Blutinkubationen ergaben. In einer systematischen Untersuchung von TURANO et al. (1974) wurde eine nicht-enzymatische Oxidation des Chlorpromazins während aller Bearbeitungsvorgänge gefunden. Bildung von CPZ-SO, CPZ-Nor₁ und CPZ-SO-NO fand auch ohne Fe^{2+} -Ionen, mit und ohne Licht, in Wasser und organischen Lösungsmitteln statt. Diese Ergebnisse entsprechen weitgehend meinen Beobachtungen.

Die nicht-enzymatische Oxidation des Substrates war, unabhängig von Licht oder Lichtausschluß, vor allem von der Bearbeitungsdauer bestimmt.

Doch kam es leichter zur Sulfoxidation als zur Demethylierung.

Reaktionshemmung

SKF 525 A ist ein vielverwendeter Inhibitor mikrosomaler Enzyme.



1954 stellten COOK et al. eine Wirkungsverlängerung des Hexobarbitals durch SKF 525 A fest, ein Phänomen, das sich bald auch mit anderen Pharmaka nachweisen ließ. Die Ursache dafür klärte BRODIE (1956), indem er die Hemmwirkung der Substanz auf den Metabolismus der Pharmaka nachwies. Das SKF 525 A wird an Mikrosomen gebunden (SCHENKMAN et al., 1972; ROGER und FOUTS, 1964) und zeigt bei vielen Biotransformationen je nach Substrat, Tierspezies, Gewebe und Versuchsbedingungen kompetitive oder nichtkompetitive Hemmwirkung. Auch Enzyminduktion durch SKF 525 A konnte nachgewiesen werden, da es selbst als Substrat fungieren kann (SCHENKMAN et al., 1972; ANDERS und MANNERING, 1966; ANDERS et al., 1966; NAVIS et al., 1953; SERRONE und FUJIMOTO, 1962; NEUMANN et al., 1963).

Hemmversuche mit SKF 525 A und mikrosomalen Enzymen des Dünndarms wurden bereits von CHHABRA und FOUTS, 1975, durchgeführt. Sie stellten eine Hemmwirkung auf die UDP-glucuronyltransferase, Anilinhydroxylase, Aminopyrindemethylase und Arylhydrocarbonhydroxylase fest. Die Hemmung des Chlorpromazinmetabolismus durch SKF 525 A wurde bisher nur mit Leber (9 000 g -Überstand) durchgeführt. Dabei fanden GILLETTE und KAMM (1960) mit Meerschweinchenleber keine Hemmung der Sulfoxidbildung. Dagegen stellten COCCIA und WESTERFELD (1967) mit Ratten- und Menschenleber eine Hemmung der Sulfoxidation, der Demethylierung und der Hydroxylierung fest, während die N-Oxidation unbeeinflusst blieb. GORROD et al. (1974) wiesen bei Meerschweinchenleber eine entsprechende Hemmwirkung nach, wobei am stärksten die

Sulfoxidation und weniger die Demethylierung betroffen war. Auch hier blieb die N-Oxidation unverändert. PEREL et al. (1974) fanden bei Rattenleber (9 000 g -Überstand) ebenfalls eine Hemmwirkung des SKF 525 A auf die Hydroxylierung, Demethylierung und Sulfoxidation des Chlorpromazins. Die erwähnten Befunde von GORROD et al. (1974) ähneln meinen Ergebnissen aus Versuchen mit Meerschweinchendarm. GORROD et al. setzten das SKF 525 A in 10^{-3} molarer Konzentration ein und erzielten eine ca. 50 %ige Hemmung der Sulfoxidbildung, während die Demethylierung bei dieser Konzentration um ca. 25 % reduziert wurde. Angaben zur eingesetzten Substratkonzentration wurden in dieser Arbeit allerdings nicht gemacht. Ich erzielte bei einer Substratkonzentration von $7,5 \times 10^{-5}$ M eine 50 %ige Hemmung der Sulfoxidation bei ca. 2×10^{-4} M/l SKF 525 A. Die Demethylierung wurde bei ca. $4,5 \times 10^{-3}$ M SKF 525 A zu 50 % gehemmt.

Die Tatsache, daß SKF 525 A einen Komplex mit Cytochrom-P₄₅₀ bildet (SCHENKMAN et al., 1972) und ich eine Hemmwirkung der Substanz auf den Chlorpromazinmetabolismus durch Darmmikrosomen feststellen konnte, weist wiederum auf eine Abhängigkeit der Reaktion vom Cytochrom-P₄₅₀ hin.

Michaeliskonstante

Bei Einsatz von Mikrosomensuspensionen als Enzymquelle können kinetische Konstanten nicht als absolut angesehen werden, da die theoretischen Berechnungen von gereinigten, löslichen Systemen ausgehen, während es sich hier um Suspensionen mit

vielen Komponenten handelt und um Enzymsysteme, die in Membranen eingebettet sind. Folglich wird oft die Bezeichnung "apparente Michaeliskonstante", $\text{app. } K_m$, verwendet. Diese Konstante gibt einen Hinweis auf die Affinität zwischen Enzym und Substrat, wobei $2 - 3 \times 10^{-5} \text{ M/l}$ für die Sulf-oxidbildung eine relativ starke Affinität vorliegt. Allerdings wurde dabei nur die Bildung von CPZ-SO berücksichtigt. Möglicherweise wurde auch CPZ-Nor₁ sulfoxidiert und CPZ-SO demethyliert. Die Bildung von CPZ-SO-Nor₁ konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei den ersten Versuchen wählte ich zum qualitativen Nachweis von Metaboliten die relativ lange Inkubationszeit von einer Stunde. Obwohl die sehr labile Aktivität der Dünndarm-mikrosomen sicher nicht über diesen Zeitraum vollständig erhalten bleibt (LEADBEATER und DAVIES, 1964), war mit steigender Inkubationsdauer doch eine Metabolitenanreicherung zu erwarten. Wie bereits erwähnt, hatten auch COCCIA und WESTERFELD (1967) bei in vitro Versuchen zum Chlorpromazinabbau durch Rattenleber mit zunehmender Inkubationsdauer mehr Metaboliten gefunden, sowohl qualitativ als auch quantitativ. Erst nach 90 min konnten sie keinen weiteren Konzentrationsanstieg der Metaboliten feststellen.

Andere Arbeitsgruppen wählten für in vitro Untersuchungen ähnlicher Art ebenfalls 60-minütige Inkubationszeit; z.B. MINDER et al., (1970), GILLETTE und KAMM (1960), LEE et al. (1970).

Wenn sich auch die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit vermindert, kann sich dies nicht auf die Bestimmung der Micha-

eliskonstanten auswirken, wie auch ein Vergleich meiner Versuche mit 60 und 30 min Inkubationszeit zeigt.

Selbstinduktion

In ihrer Arbeit von 1972 vermuteten SAKALIS et al., daß Chlorpromazin seinen eigenen Abbau in Leber und Darm stimuliert. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits eine Induktion verschiedener Enzyme, vor allem in der Leber, durch Vorbehandlung mit Chlorpromazin nachweisen (KATO und VASSANELLI, 1962; WATTENBERG und LEONG, 1964; KOLAKOWSKA und FRANKLIN, 1975; DUBE et al., 1972; FEUER et al., 1970; BREYER, 1971; VALERINO et al., 1973).

Mit Hilfe anderer Substanzen gelang es auch, im Darm Enzyme zu induzieren (z.B. SCHARF und ULLRICH, 1974; LEHRMANN et al., 1972; MISTILLIS und BIRCHALL, 1969; GELBOIN und BLACKBURN, 1964; WATTENBERG et al., 1962; DAO und VARELA, 1966). In einer Arbeit von 1965 beschrieben WATTENBERG und LEONG eine Enzyminduktion der Benzpyrenhydroxylase im Dünndarm durch Chlorpromazin. Andererseits wurde auch schon eine verminderte Enzymaktivität durch Phenothiazingabe gefunden (MOODY et al., 1967; GRAM und OVERB, 1972). Mit induzierenden Stoffen wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren u.a. kann der Metabolismus des Chlorpromazins in der Leber gesteigert werden (GORROD et al., 1974). Meine Versuche zur Selbstinduktion des Chlorpromazins in der Darmmukosa führten zu negativen Ergebnissen. Durch orale Gabe von Chlorpromazin gelang es nicht, eine Aktivitätssteigerung des Chlorpromazin-

metabolismus in vitro nachzuweisen. Auch ein Anstieg des Cytochrom-P₄₅₀-Gehalts pro mg Protein konnte nicht festgestellt werden. Trotzdem ist eine derartige Selbstinduktion nicht ausgeschlossen. BREYER (1971) gelang es, die Demethylierung von Perazin in der Leber durch orale Perazingabe zu steigern. Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Perazin und Chlorpromazin hält die Autorin es für sehr wahrscheinlich, daß auch Chlorpromazin seinen eigenen Metabolismus stimuliert. Ob das für Leber und Darm gleichermaßen gilt, läßt sich bisher nicht beantworten.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Vermutung, daß Chlorpromazin bei oraler Gabe bereits während der Absorption im Darm inaktiviert werden kann. Der Abbau von Chlorpromazin durch Darmmikrosomen ließ sich anhand der beschriebenen in vitro Versuche beim Meerschweinchen nachweisen. Bei dem vorliegenden Enzymsystem handelt es sich wahrscheinlich um eine mischfunktionelle Oxidase, die vom Cytochrom-P₄₅₀ als einer Komponente des intestinalen Elektronentransportsystems, abhängig ist. Fraglich ist, inwieweit der Chlorpromazinabbau in der Darmmukosa im Vergleich zu dem in der Leber von Bedeutung ist. Dabei ist auch zu bedenken, daß der Umfang des Darmmetabolismus von der Größe der Mukosaoberfläche und der Aufenthaltsdauer des Pharmakons im Darm, der Aktivität der Darmbakterien und anderen Faktoren abhängt. Die Frage, ob und in welchem Maße die Inaktivierung des Chlorpromazins im Darm für die Wirkungsdifferenzen beim Menschen verantwortlich ist, konnte mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Zusammenfassung

1. Chlorpromazin wird durch Mikrosomen aus Meerschweinchendünndarmmukosa enzymatisch metabolisiert. Es bilden sich hauptsächlich Chlorpromazinsulfoxid und Monodesmethylchlorpromazin.
 - a. Bei 0°C findet kein messbarer enzymatischer Umsatz statt. Chlorpromazin wird jedoch in geringem Umfang auch nicht-enzymatisch oxidiert.
 - b. Während der Aufbewahrung der Mikrosomen bei -25°C bleibt die enzymatische Aktivität und der Cytochrom-P₄₅₀-Gehalt über mindestens zwei Monate erhalten.
2. Mikrosomen aus Rattendünndarmmukosa und aus menschlicher Dünndarmmukosa setzen unter den gewählten Bedingungen Chlorpromazin, bzw. Perazin, nicht um.
 - a. In Mikrosomensuspensionen aus Dünndarmmukosa von Ratten läßt sich im Gegensatz zu Mikrosomen aus Meerschweinchendarm, nur bei Begasung mit Kohlenmonoxid oder Stickstoff während des Herstellungsvorganges Cytochrom-P₄₅₀ nachweisen.
In menschlichem Darmgewebe läßt sich kein Cytochrom-P₄₅₀ nachweisen.

3. Die Mikrosomenfraktion aus Meerschweinchendarmmukosa enthält durchschnittlich $0,16 \pm 0,02$ nM Cytochrom-P₄₅₀/mg Protein.

- a. Die K_m -Werte der Reaktionen sind:

2 - 3×10^{-4} M/l für die Sulfoxidbildung und

4 - 5×10^{-5} M/l für die Demethylierung.

- b. Die Sulfoxidation verläuft über 30 min, die Demethylierung bis zu 50 min linear. Unter den beschriebenen Bedingungen betragen die Anfangsgeschwindigkeiten:

$5,5 \times 10^{-10}$ (Mol $\times$ min⁻¹ $\times$ mg⁻¹) für die Sulfoxidbildung

$2,2 \times 10^{-10}$ (Mol $\times$ min⁻¹ $\times$ mg⁻¹) für die Demethylierung.

4. Die Sulfoxidation und Demethylierung des Chlorpromazins durch Meerschweinchendarmmikrosomen lassen sich durch SKF 525 A hemmen. Die IC₅₀-Werte betragen:

2×10^{-4} M/l für die Sulfoxidbildung und

$4,5 \times 10^{-3}$ M/l für die Demethylierung.

5. Durch orale Chlorpromazingabe läßt sich der Chlorpromazinmetabolismus durch Dünndarmmikrosomen vom Meerschweinchen nicht induzieren.

Literaturverzeichnis

ADAMSON, L., S.H.CURRY, P.K.BRIDGES, A.F.FIRESTONE,
N.J.LAVIN, D.M.LEWIS, R.D.WATSON, C.M.XAVIER,
J.A.ANDERSON:

Fluphenazine Decanoate Trial in Chronic In-patient Schizo-
phrenics Failing to Absorb Oral Chlorpromazine.
Diseases of the Nervous System (1973), 181-191

ALFREDSSON, G., F.A.WIESEL, P.SKETT:

Levels of Chlorpromazine and its Active Metabolites in
Rat Brain and the Relationship to Central Monoamine
Metabolism and Prolactin Secretion.
Psychopharmacology, 53 (1977), 13-18, No.1

ANDERS, M.W., A.P.ALVARES, G.J.MANNERING:

Inhibition of Drug Metabolism. II. Metabolism of 2-Diethyl-
aminoethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525 A).
Mol.Pharmacol., 2 (1966), 328-334

ANDERS, M.W., G.J.MANNERING:

Inhibition of Drug Metabolism. I. Kinetics of the Inhibition
of the N-Demethylation of Ethylmorphine by 2-Diethylamino-
ethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525 A) and Related
Compounds.
Mol.Pharmacol., 2 (1966), 319-327

ANDERS, M. W., G. J. MANNERING:

Inhibition of Drug Metabolism. IV. Induction of Drug Metabolism by 2-Diethylaminoethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525 A) and 2,4-Dichloro-6-phenylphenoxyethyl-diethylamine HBr (Lilly 18947) and the Effect of Induction on the Inhibitory Properties of SKF 525 A Type Compounds.

Mol. Pharmacol., 2 (1966), 341-346

BAKER, J. R., STERLING CHAYKIN:

The Biosynthesis of Trimethylamine-N-Oxide.

The Journal of Biological Chemistry, 237 No. 4 (1962), 1309-1313

BICKEL, M. H., FLÜCKINGER, M. BAGGIOLINI:

Vergleichende Demethylierung von tricyclischen Psychopharmaka durch Rattenleber-Mikrosomen.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. u. exp. Path. 256 (1967), 360-366

BICKEL, M. H., J. W. STEELE:

Binding of Basic and Acidic Drugs to Rat Tissue Sub-cellular Fractions.

Chem. -Biol. Interactions, 8 (1974), 151-162

BORTON, P., R. CARSON, D. J. REED:

Stability of suspensions of rat liver microsomes quick-frozen with liquid nitrogen and stored at -85° .

Biochem. Pharmacol., 23, (1974), 2332-2334

BREYER, U.:

Der Stoffwechsel von Perazin in vitro.

Arch. exper. Path. Pharmacol., 266 (1970), 302

BREYER, U.:

Metabolism of the Phenothiazine Drug Perazine by
Liver and Lung Microsomes from Various Species.

Biochem. Pharmacol., 20 (1971), 3341-3351

BREYER, U.:

Perazine, Chlorpromazine and Imipramine as Inducers
of Microsomal Drug Metabolism.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 272 (1972),
277-288

BREYER, U., D. WINNE:

Absorption and Metabolism of the Phenothiazine Drug
Perazine in the Rat Intestinal Loop.

Biochem. Pharmacol., 26 (1977), 1275-1280

BRODIE, B. B., J. AXELROD, J. R. COOPER, L. GAUDETTE,

B. N. LaDU, C. MITOMA, S. UDENFRIEND:

Detoxication of Drugs and Other Foreign Compounds by
Liver Microsomes.

Science, 121 (1955), 603-604

BRODIE, B. B., J. R. GILLETTE, B. N. LaDU:

Enzymatic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds.

Ann. Rev. Biochem., 27 (1958), 427-454

BULGER, W. H., S. J. STOHS:

Stability of Mixed Function Oxidases in Frozen Rabbit Liver.

Research Comm. in Chem.Path. and Pharmacol., 11 No3.
(1975), 467-474

BURKE, M. D., J. W. BRIDGES:

The Influence of Storage Conditions on Microsomal Drug-Metabolizing Activity.

Biochem.J., 130 (1972), 71p-72p

CHHABRA, R. S., J. R. FOUTS:

Biochemical Properties of some Microsomal Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rabbit Small Intestine.

Drug Metabolism and Disposition, 4 No. 3 (1976), 208-214

CHHABRA, R. S., R. J. POHL, J. R. FOUTS:

A Comparative Study of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Liver and Intestine of Various Animal Species.

Drug Metabolism and Disposition, 2 No. 5 (1974), 443-447

CLARK, M. L., P. N. KAUL:

A Preliminary Report on Clinical Response and Blood Levels of Chlorpromazine and its Sulfoxide During Chlorpromazine Therapy in Chronic Schizophrenic Patients.

Psychopharmacol. Bull., 11 (1975), 28-30

COCCIA, P. F., W. W. WESTERFELD:

The Metabolism of Chlorpromazine by Liver Microsomal Enzyme Systems.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 157 No. 2 (1967), 446-458

COOK, L., E. MACKO, E. J. FELLOWS:

The Effect of β -Diethylaminoethyldiphenylpropylacetate Hydrochloride on the Action of a Series of Barbiturates and C. N. S. Depressants.

J. Pharmacol. exp. Ther., 112 (1954), 382-386

COPER, H. :

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. FORTH, D. HENSCHLER, W. RUMMEL (Hrsg.)
II. Auflage (1977), S. 433-450

CORREIA, M. A., R. SCHMID:

Effect of Cobalt on Microsomal Cytochrome-P₄₅₀:

Differences between Liver and Intestinal Mucosa.

Biochem. and Biophysic. Res. Comm., 65 No. 4 (1975),
1378-1384

CRYER, A., W. BARTLEY:

The Effect of Storage on Enzyme Activities in Tissues.

Biochem. J., 144 (1974), 433-434

CURRY, S. H. :

Chlorpromazine: Concentrations in Plasma, Excretion
in Urine and Duration of Effect.

Roy. Soc. Med., London, 64 (1971), 285-289

CURRY, S. H. :

Fluphenazin- und Fluphenazindekanoat-Plasmaspiegel beim
Menschen. In: Klinik und Pharmakologie der Langzeitneuro-
leptika, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1977

CURRY, S. H., J. M. DAVIS, D. S. JANOWSKY, M. D. BETHESDA,
J. H. L. MARSHALL:

Factors Affecting Chlorpromazine Plasma Levels in
Psychiatric Patients.

Arch. Gen. Psychiat., 22 (1970), 209-215

CURRY, S. H., A. D' MELLO, G. P. MOULD:

Destruction of chlorpromazine during absorption in the
rat in vivo and in vitro.

Brit. J. Pharmac., 42 (1971), 403-411

CURRY, S. H., J. H. L. MARSHALL:

Plasma Levels of Chlorpromazine and some of its Rela-
tively Non-polar Metabolites in Psychiatric Patients.

Life Sci., 7 (1968), 9-17

DAO, T. L., R. M. VARELA:

On the Mechanism of Inducing Protection of the Adrenal Cor-
tex against Injury from 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. I. Ef-
fect of Inducers on Benzpyrene Hydroxylase Activity.

Cancer Res., 26A (1966), 1015-1021

DAVIDSON, J. D., L. L. TERRY, A. SJOERDSMA:

Action and Metabolism of Chlorpromazine Sulfoxide
in Man.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 121 (1957), 8-12

DELAY, J.; DENIKER, P., HARL, J. M.:

Utilisation en thérapeutique psychiatrique d'une phenothia-
zine d'action centrale électorive.

Annls. méd.-psychol. 110 (1952), 112-117

DIETSCHY, J. M., M. D. SIPERSTEIN:

Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract: Loca-
lization and mechanisms of control.

J. of Clinical Investigation 44, No. 8 (1965), 1311-1327

DUBE, D. K., H. N. DUTTA, B. PAL, J. J. GHOSH:

Effect of chlorpromazine on induction of different hepatic
enzymes.

Biochem. Pharmacol. 21 (1972), 2249-2251

ECOBICHON, D. J.:

Preparation of guinea pig hepatic microsomes: a compa-
rison of three techniques.

Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 14, No. 3 (1976), 515-525

EISENTHAL, R.:

The direct linear plot.

Biochem. J. 139 (1974), 715-720

FEUER, G., J. C. SOSA-LUCERO, G. LUMB, G. MODDEL:

Failure of Various Drugs to Induce Drug-Metabolizing
Enzymes in Extrahepatic Tissues of the Rat.

Toxicology and Applied Pharmacology 19 (1971) 579-589

GELBOIN, H. V. , N.R. BLACKBURN:

The Stimulatory Effect of 3-Methylcholanthrene on Benzpyrene Hydroxylase Activity in Several Rat Tissues: Inhibition by Actinomycin D and Puromycin.

Cancer Res. 24 (1964), 356-360

GILLETTE, J. R. , D. C. DAVIS, H. A. SASAME:

Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism.

Ann. Rev. Pharmacol. 12 (1972), 57-84

GILLETTE, J. R. , J. J. KAMM:

The enzymatic formation of sulfoxides: The oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 130 (1960), 262-267

GOODMAN, L. S. , A. GILMAN:

The Pharmacological Basis of Therapeutics.

4th Edition, 1970. The Macmillan Company,

London-Toronto.

GORROD, J. W. , C. R. LAZARUS, A. H. BECKETT:

Some Aspects of the In Vitro Oxidation of ³⁵S-Chlorpromazine.

Advances in Biochem. Psychopharmacol. Vol. 9, Raven Press, New York, (1974), 191-200

GOUCHER, C. , J. J. WINDLE, L. LEVY:

Stable Enzyme Inhibitors and Stable Free Radical Species in Ultraviolet-Irradiated Solutions of Chlorpromazine.

Molecular Pharmacol. 11 (1975), 603-612

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. XXVIII/2
(1971)

HARTIALA, K. :

Metabolism of Hormones, Drugs and Other Substances
by the Gut.

Physiol. Rev. 53, No. 2 (1973), 496-534

HEWICK, D. S., J. R. FOUTS:

Effects of storage on hepatic microsomal cytochromes
and substrate-induced difference spectra.

Biochem. Pharmacol. 19 (1970), 457-472

HOENSCH, H, C. H. WOO, S. B. RAFFIN, R. SCHMID:

Oxidative metabolism of foreign compounds in rat small
intestine: cellular localization and dependence on dietary
iron.

Gastroenterology 70 (1976), 1063-1070

HOENSCH, H., C. H. WOO, R. SCHMID:

Cytochrome P-450 and drug metabolism in intestinal villous
and crypt cells of rats: effect of dietary iron.

Biochem. Biophysic. Res. Comm. 65, No. 1 (1975), 399-406

HUANG, C. L., F. L. SANDS:

Effect of ultraviolet Irradiation on Chlorpromazine II.

J. Pharm. Sci. 56 (1967), 259-264

JANDER/BLASIUS:

Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum
S. Hirzel. Stuttgart 1971

KAMATH, S. A., F. A. KUMMEROW, K. A. NARAYAN:

A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes.

Febbs Letters 17, No. 1 (1971), 90-92

KAMATH, S. A., E. RUBIN:

Interaction of calcium with microsomes: a modified method for the rapid isolation of rat liver microsomes.

Biochem. Biophysic. Res. Comm. 49, No. 1 (1972), 52-59

KATO, R., P. VASSANELLI:

Induction of increased meprobamate metabolism in rats pretreated with some neurotropic drugs.

Biochem. Pharmacol. 11 (1962), 779-794

KOLAKOWSKA, T., M. FRANKLIN, B. ALAPIN:

Effect of long-term phenothiazine treatment on drug metabolism.

Br. J. clin. Pharmac. 2 (1975), 25-28

KUPFER, D., E. LEVIN:

Monooxygenase drug metabolizing activity in CaCl_2 -aggregated hepatic microsomes from rat liver.

Biochem. Biophysic. Res. Comm. 47, No. 3 (1972), 611-618

LaDU, B. N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF, B. B. BRODIE:

Enzymatic dealkylation of aminopyrine (Pyramidon)
and other alkylamines.

J. Biol. Chem. 214 (1955), 741-752

LAL, S., T. L. SOURKES:

Effect of various chlorpromazine metabolites on amphetamine-induced stereotyped behaviour in the rat.

Europ. J. Pharmacol. 17 (1972), 283-286

LEADBEATER, L., D. R. DAVIES:

The stability of the drug metabolizing enzymes of liver microsomal preparations.

Biochem. Pharmacol. 13 (1964), 1607-1617

LEE, Y. C., M. G. J. HAYES, D. B. McCORMICK :

Microsomal oxidation of a α -thiocarboxylic acids to sulf-oxides.

Biochem. Pharmacol. 19 (1970), 2825-2832

LEENHEER de, A. :

Ultraviolet Spectrophotometry of Phenothiazine Derivatives and Analogs.

J. Ass. Off. Agricultural Chem. 56, No. 1 (1973), 105-118

LEHRMANN, CH., V. ULLRICH, W. RUMMEL:

Phenobarbital Inducible Drug Monooxygenase Activity in the Small Intestine of Mice.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276 (1973), 89-98

LENK, W. :

Application and interpretation of kinetic analyses from the microsomal drug metabolizing oxygenases.

Biochem. Pharmacol. 25 (1976), 997-1005

LEVIN, W., A. ALVARES, M. JACOBSON, R. KUNTZMANN:

Effect of storage of frozen liver microsomal preparations on the hydroxylation of testosterone and pentobarbital and the N-demethylation of ethylmorphine.

Biochem. Pharmacol. 18 (1969), 883-889

LEWIS, D. M., S. H. CURRY, G. SAMUEL:

Long-acting Phenothiazines in Schizophrenia.

Br. Med. J. 1971, 671-672

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL:

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275

MACHINIST, J. M., W. H. ORME-JOHNSON, D. M. ZIEGLER:

Microsomal Oxidases. II. Properties of a Pork Liver Microsomal N-Oxide Dealkylase.

Biochemistry 5 (1966), 2939-2943

MANIAN, A. A., D. H. EFRON, S. R. HARRIS:

Appearance of monohydroxylated chlorpromazine metabolites in the central nervous system.

Life Sci. 10 Part I (1971), 679-684

MANN, P. J. G., J. H. QUASTEL:

Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism.

Biochem. J. 35 (1941), 502-516

MINDER, R., F. SCHNETZER, M. H. BICKEL:

Hepatic and Extrahepatic Metabolism of the Psychotropic Drugs
Chlorpromazine, Imipramine, and Imipramine-N-Oxide.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 268 (1971), 334-347

MISTILIS, S. P., A. BIRCHALL:

Induction of Alcohol Dehydrogenase in the Rat.

Nature 223 (1969), 199-200

NAGY, A.:

Blood and brain concentrations of imipramine, clomipramine
and their monomethylated metabolites after oral and intra-
muscular administration in rats.

J. Pharm. Pharmac. 29 (1977), 104-107

NEUMANN, N. R., T. S. MIYA, W. F. BOUSQUET:

Mechanism of Development of Tolerance to B-Diethylamino-
ethyl Diphenylpropylacetate (SKF 525-A) in the Rat (28608)

Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 114 (1963), 141-145

OMURA, T., R. SATO:

A New Cytochrome in Liver Microsomes.

J. Biol. Chem. 237, No. 4 (1962), PC 1375-1376

OMURA, T., R. SATO:

The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes.

I. Evidence for its Hemoprotein Nature.

J. Biol. Chem. 239, No. 7 (1964), 2370-2378

OMURA, T., R. SATO:

The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes.

II. Solubilization, Purification, and Properties.

J. Biol. Chem. 239, No. 7 (1964), 2379-2385

ORRENIUS, S., A. BERG, L. ERNSTER:

Effects of Trypsin on the Electron Transport Systems
of Liver Microsomes.

Europ. J. Biochem. 11 (1969), 193-200

PANTUCK, E. J., K. C. HSIAO, W. D. LOUB, L. W. WATTENBERG,
R. KUNTZMAN, A. H. CONNEY:

Stimulatory effect of vegetables on intestinal drug metabolism in the rat.

J. Pharmacol. exp. Ther. 198 (1976), 278-283

PEREL, J. M., L. O'BRIEN, N. B. BLACK, G. D. BELLWARD,
P. G. DAYTON:

Imipramine and Chlorpromazine in Hepatic Microsomal
Systems.

Adv. Biochem. Pharmacol. Vol. 9 : The Phenothiazines and
Structurally Related Drugs. J. S. Forrest, C. J. Carr, E. Usdin
(eds.), 1974, pp. 201-212

POSNER, H. S. , E. HEARST, W. L. TAYLOR, G. J. COSMIDES:

Model metabolites of chlorpromazine and promazine:
relative activities in some pharmacological and behavioral tests.

J. Pharmacol. exp. Ther. 137 (1962), 84-90

RANCE, M. J. , J. S. SHILLINGFORD:

The role of the gut in the metabolism of strong analgesics.

Biochem. Pharmacol. 25 (1976), 735-741

REINKE, L. A. , S. J. STOHS:

Instability of mixed function monooxygenases in frozen
rat liver.

Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 14, No. 2 (1976),
295-303

RIVERA-CALIMLIM, L. :

Plasma Chlorpromazine in Psychiatric Management.

Psychopharmacol. 11 (1975), 76-77

RIVERA-CALIMLIM, L.

Impaired absorption of chlorpromazine in rats given tri-
hexyphenidyl.

Br. J. Pharmac. 56 (1976), 301-305

RIVERA-CALIMLIM, L. , L. CASTANEDA , L. LASAGNA:

Effects of mode of management on plasma chlorpromazine
in psychiatric patients.

Clin. Pharmacol. Ther. 14, No. 6 (1973), 978-986

ROBINSON, A. E. , V. H. BEAVEN:

Hydroxylation in vitro of pharmacologically active pheno-
thiazine derivatives.

J. Pharm. Pharmacol. 16 (1964), 342-346

ROGERS, L.A., J.R.FOUTS:

Some of the interactions of SKF 525-A with hepatic microsomes.

J.Pharmacol.exp.Ther. 146 (1964), 286-293

ROSS, J.J. Jr., T.L.FLANAGAN, A.R.MAASS:

In vitro Metabolism of 2-Chloro-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazine. III. Isolation and Identification of Metabolites.

J.Med.Pharm.Chem. 5 (1962), 1035-1041

SAKALIS, G., T.L.CHAN, S.GERSHAN, S.PARK:

The Possible Role of Metabolites in Therapeutic Response to Chlorpromazine Treatment.

Psychopharmacologia 32 (1973), 279-284

SAKALIS, G., S.H.CURRY, G.P.MOULD, M.H.LADER:

Physiologic and clinical effects of chlorpromazine and their relationship to plasma level.

Clin.Pharmacol.Ther. (1972), 931-946

SAKURAI, Y., T.NAKAHARA, R.TAKAHASHI:

Prediction of Response to Chlorpromazine Treatment in Schizophrenics.

Psychopharmacologia 44 (1975), 195-203

SALZMAN, N.P., B.B.BRODIE:

Physiological Disposition and Fate of Chlorpromazine and a Method for its Estimation in Biological Material.

J.Pharmacol.exp.Ther. 118 (1956), 46-54

SCHARF, R., V. ULLRICH:

In vitro Induction by Phenobarbital of Drug Monooxygenase Activity in Mouse Isolated Small Intestine.

Biochem. Pharmacol. 23 (1974), 2127-2137

SCHENKMANN, J. B., D. L. CINTI:

Hepatic Mixed Function Oxidase Activity in Rapidly Prepared Microsomes.

Life Sci. 11/II (1972), 247-257

SCHENLMANN, J. B., B. J. WILSON, D. L. CINTI:

Diethylaminoethyl 2, 2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525-A)-in vivo and in vitro Effects of Metabolism by Rat Liver Microsomes - Formation of an Oxygenated Complex.

Biochem. Pharmacol. 21 (1972), 2373-2383

SERRONE, D. M., J. M. FUJIMOTO:

The Effect of Certain Inhibitors in Producing Shortening of Hexobarbital Action.

Biochem. Pharmacol. 11 (1962), 609-615

SUNDARESAN, P. R., L. RIVERA-CALIMLIM:

Distribution of Chlorpromazine in the Gastrointestinal Tract of the Rat and Its Effect on Absorptive Function.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 194 (1975), 593-602

SUNDARESAN, P. R., L. RIVERA-CALIMLIM:

Effect of Chlorpromazine on L-Methionine Transport in the Rat Intestine.

Biochem. Pharmacol. 26 (1977), 1411-1415

SVED, S., A. PERALES, D. PALAIC:

Chlorpromazine Metabolism in Chronic Schizophrenics.

Br. J. Psychiat. 119 (1971), 589-596

TREDGER, J. M., R. S. CHHABRA:

Preservation of Various Microsomal Drug Metabolizing Components in Tissue Preparations from the Livers, Lungs, and Small Intestines of Rodents.

Drug Metabolism and Disposition, 4, No. 5 (1976), 451-459

TURANO, P., W. M. J. TURNER:

Thin-Layer Chromatography of Chlorpromazine Metabolites. Attempt to Identify Each of the Metabolites Appearing in Blood, Urine, and Feces of Chronically Mediated Schizophrenics.

J. Chromatograph. 75 (1973), 277-293

TURANO, P., W. J. TURNER, D. DONATO:

Further Studies of Chlorpromazine Metabolism in Schizophrenic Men.

Adv. Biochem. Pharmacol., Vol. 9 (1974) pp. 315-322

ULLRICH, V. :

Enzymatische Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff.

Angewandte Chemie, 84. Jahrgang (1972), Heft 15, 689-724

VALERINO, D. M., E. S. VESELL, A. O. JOHNSON, K. C. AURORI:

Effects of Various Centrally Active Drugs on Hepatic Microsomal Enzymes: A Comparative Study.

Drug Metabolism and Disposition, 1, No. 5 (1973), 669-678

WADE, A. E. , B.WU, F.E.GREENE:

Some in vitro Assay Conditions that Affect Quantitation
and Stability of Cytochromes P-450 and b₅.

Toxicology and Applied Pharmacology 22 (1972), 503-512

WALSH, C. T. , R.R.LEVINE:

Drug Absorption in Rats Pretreated with Antibiotics.

J.Pharmacol.exp.Ther. 188 , No. 2 (1974), 277-286

WATTENBERG, L. W. , J. L. LEONG:

Effects of Phenothiazines on Protective Systems Against
Polycyclic Hydrocarbons.

Cancer Res. 25 (1965), 365-370

WATTENBERG, L. W. , J. L. LEONG, P. J. STRAND:

Benzpyrene Hydroxylase Activity in the Gastrointestinal
Tract.

Cancer Res. 22 (1962), 1120-1125

ZACHARIAH, P. K. , M. R. JUCHAU:

Inhibition of Human Placental Mixed Function Oxidations
with Carbon Monoxide: Reversal with Monochromatic Light.

J.Steroid Biochem. 8 (1977), 221-228

Herrn Professor Dr. med. Helmut Coper möchte ich für die Förderung der Arbeit durch viele Anregungen und Hinweise herzlich danken.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfram Christ für seine wertvolle Betreuung und seine zahlreichen Ratschläge danken.

LEBENS LAUF

geboren am	9. September 1950 in Berlin
Eltern	Dr. Waldemar Knoll und Eva Knoll, geb. Kalicki
Schulausbildung	1957 bis 1970 Liebfrauenschule, Berlin
Abitur	20. Januar 1970
Praktikum	Frühjahr 1970 bis Herbst 1971; Hofapotheke, Berlin
Pharmaziestudium	Freie Universität Berlin, Beginn WS 1971
Pharmazeutische Prüfung	23. Oktober 1975
Approbation als Apotheker	26. Februar 1976
Beginn der Dissertation	Mai 1975 im Institut für Neuropsychopharmakologie der Freien Universität Berlin, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Helmut Coper

DISSERTATIONSDRUCK

HÖPFNER GMBH

Pestalozzistr. 106

1 Berlin 12



312 88 85

313 81 98

